Enzymatische Esterbildung und Esterspaltung

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

genehmigt

von der Philosophischen Fakultät der
Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin

Von

ERNST CHAIN

aus Berlin.

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Juli 1932
Tag der Promotion: 25. Juli 1932

31. Mai 1933

386

Referenten: Prof. Dr. W. Schlenk
Prof. Dr. M. Bodenstein

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Meiner lieben Mutter
und Frau Anna Sacharina
in Dankbarkeit

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41533918_0016

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit folgenden Fragen:

1. Über die kinetischen Vorgänge bei der enzymatischen Ester*synthese* liegen bis jetzt nur sehr wenige Arbeiten vor. Durch neue experimentelle Untersuchungen an bisher noch nicht verwandten Substraten soll das vorhandene Tatsachenmaterial erweitert werden.

2. Durch einige Arbeiten ist bekannt, daß im allgemeinen Ester, deren Alkohol- oder Säurekomponente ein asymmetrisches C-Atom enthält, durch das Ferment asymmetrisch synthetisiert werden. Indessen liegen in quantitativer Hinsicht über den Gang der optischen Auswahl bei der fermentativen Estersynthese noch keine Untersuchungen vor. Nun sind durch das charakteristische Verhalten des Ferments bei der Hydrolyse von Estern mit asymmetrischem C-Atom gerade in quantitativer Hinsicht im Laufe der Untersuchungen wichtige theoretische Folgerungen und Einblicke in den Wirkungsmechanismus der Fermentreaktion möglich geworden. Deshalb schien die quantitative Verfolgung des optischen Auswahlvermögens durch das Ferment in Abhängigkeit vom Grade der Synthese von Wichtigkeit.

3. Das Studium der Kinetik des optischen Auswahlvermögens bei der fermentativen Ester*hydrolyse* war bisher fast nur an Estern durchgeführt worden, deren Asymmetriezentrum im Säurerest lag. Es war daher zu untersuchen, wie das Ferment sich solchen Estern gegenüber verhält, deren Asymmetriezentrum in der Alkoholkomponente liegt.

4. Charakteristisch für die fermentative Hydrolyse ist die Beeinflußbarkeit der Hydrolysengeschwindigkeit durch den Zusatz gewisser Stoffe, die als „Hemmungskörper" bezeichnet werden. Es war nachzuprüfen, ob diese Stoffe bei der Ester*synthese* analoge Wirkungen zeigen.

5. Beim Studium der Hydrolyse der von uns gewählten Ester, die praktisch völlig wasserunlöslich sind, hatten wir Stellung zu nehmen zu der Frage der Anwendbarkeit des Massenwirkungsgesetzes auf die Kinetik der enzymatischen Esterhydrolyse.

6. Beim Studium der fermentativen Ester-*Synthese* konnten wir die Feststellung machen, daß die Synthese-Kinetik weitgehend von Faktoren abhängig ist, die als spurenweise Beimengungen der zu synthetisierenden Substrate bei verschiedener Darstellungsweise derselben auftreten können, ohne daß sie sich mit den gewöhnlichen chemischen Methoden nachweisen lassen. Alkohole, die anscheinend völlig identisch sind, werden je nach der Darstellung in dem einen Falle sehr gut, in dem anderen überhaupt nicht verestert. Diese Beobachtung, die für Fermentreaktionen allgemeine Bedeutung hat, war weiter auszuarbeiten; die verschiedenen Substrate mußten auf verschiedene Weise dargestellt und auf ihre Kinetik untersucht werden.

Eine allgemeine Literaturübersicht über die stereochemische Spezifität der Esterasen ist von *R. Ammon*[1] zusammengestellt worden. Die asymmetrische *Hydrolyse* ist an den Beispielen der racemischen und optisch-aktiven Mandelsäureester eingehend von *R. Willstätter*, *E. Bamann* und Mitarbeitern sowie von *P. Rona*, *R. Ammon* und Mitarbeitern untersucht worden.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind die folgenden:

1. Die Esterasen zeigen eine ausgeprägte Konfigurationsspezifität zu den einzelnen optisch aktiven Modifikationen.

2. Es ließen sich quantitative Aussagen über Bildungs- und Zerfallsgeschwindigkeiten der diastereomeren Zwischenprodukte machen und Rückschlüsse auf gewisse bei der Spaltung beobachtete Vorgänge ziehen (Aktivitäts-P_s-Kurven; eine Esterase bevorzugt z. B. bei der Spaltung der racemischen Mandelsäureester die d-Modifikation, bei der Hydrolyse der einzelnen aktiven Formen wird durch dasselbe Ferment der l-Ester schneller gespalten; die Dissoziationskonstanten und Zerfallskonstanten lassen sich an einigen Beispielen nach der *Weber-Ammon*schen Formel zusammenfassen, die es gestattet, die aus der Racemathydrolyse erhaltenen Ergebnisse zu den Ergebnissen aus der Hydrolyse der optischen Modifikationen in Beziehung zu setzen usw.).

3. Das optische Auswahlvermögen der Esterasen ist durch optisch-aktive wie auch durch optisch inaktive Stoffe, durch Variation der Konzentration des racemischen Substrats, durch verschiedene Vorbehandlung des Ferments beeinflußbar (*Bamann*).

Über die fermentative Ester-*Synthese* liegen im ganzen bisher nur wenige Arbeiten vor. Ihre Ergebnisse sind kurz die folgenden:

1. Bei der fermentativen Synthese von Estern, die im Säurerest oder im Alkoholrest ein asymmetrisches C-Atom haben, bevorzugt das Ferment wie bei der Hydrolyse im allgemeinen eine optische Modifikation[2]. Eine

---

[1] Fermentforsch. **11**, 459, 1930.

[2] *Rona* u. *Ammon*, diese Zeitschr. **217**, 34, 1930; *Rona*, *Ammon* u. *Werner*, ebendaselbst **221**, 381, 1930.

Ausnahme hiervon stellt die fermentative Veresterung der Mandelsäure dar, die unter den verschiedensten Bedingungen stets symmetrisch verestert wird[1].

2. Wie bei der Hydrolyse ist auch bei der Synthese die Aufstellung von Aktivitäts-P_s-Kurven bei Auswahl geeigneter Substrate möglich, so daß auf einen ähnlichen Reaktionsmechanismus (Bildung und Zerfall von Ferment-Substratverbindungen) geschlossen werden darf[2].

Wir haben in der vorliegenden Untersuchung ausschließlich Buttersäureester synthetisiert und gespalten, weil die Buttersäure das Ferment nach den allgemeinen Erfahrungen nur wenig schädigt, leicht verestert wird und ihre Ester leicht gespalten werden.

Die Auswahl der zu verwendenden Alkohole war nicht ganz einfach, weil sie nach folgenden Prinzipien zu geschehen hatte:

1. Der Alkohol mit asymmetrischem C-Atom mußte überhaupt vom Ferment verestert und seine Buttersäureester fermentativ spaltbar sein.

2. Er mußte flüssig sein, denn bei der Verwendung eines festen Alkohols muß bei der fermentativen Synthese Aceton bzw. Äther als Lösungsmittel und Reaktionsmilieu für Alkohol und Säure verwendet werden[2]; dadurch wird erstens die Synthese im allgemeinen immer erschwert, und zweitens mußten wir bei unseren Versuchen, wo es sich um quantitative Bestimmungen der Konfigurationsspezifität handelte, nach Möglichkeit alle Fremdkörper ausschalten, da sie einen Einfluß auf diese haben können (*Bamann* und *Laeverenz*[3] fanden, daß sogar der optisch inaktive Äthylalkohol einen starken Einfluß auf die Konfigurationsspezifität der Menschenleberesterase bei der Spaltung des racemischen Mandelsäure-äthylesters hat).

3. Die Alkohole sollten ohne allzu große präparative Schwierigkeiten darstellbar sein, weil für die fermentativen Syntheseansätze sehr große Mengen benötigt werden.

4. Das spezifische Drehungsvermögen der optischen Modifikationen sollte möglichst hoch sein.

Wir fanden als geeignete Substrate, die allen Anforderungen entsprechen, die phenylierten sekundären Carbinole vom Typ $C_6H_5 . CHOH . R$. Wir untersuchten die homologen Carbinole vom Methyl-Phenyl-Carbinol bis zum Butyl-Phenyl-Carbinol sowie ihre Buttersäureester.

Präparativer Teil.

1. Darstellung der Carbinole.

Es wurden dargestellt:

Methyl-Phenyl-Carbinol, $C_6H_5 . CHOH . CH_3$,
Äthyl-Phenyl-Carbinol, $C_6H_5 . CHOH . CH_2 . CH_3$,
Propyl-Phenyl-Carbinol, $C_6H_5 . CHOH . CH_2 . CH_2 . CH_3$,
Butyl-Phenyl-Carbinol, $C_6H_5 . CHOH . CH_2 . CH_2 . CH_2 . CH_3$,

---

[1] *Rona, Ammon* u. *Oelkers*, diese Zeitschr. **231**, 59, 1931; *Rona, Ammon* u. *Trurnit*, vgl. S. 100.

[2] *Rona, Ammon* u. *Fischgold*, ebendaselbst **241**, 460, 1931, ferner *Sym*, ebendaselbst **230**,, 19, 1931.

[3] Ber. d. Deutsch. Chem. Ges. **64**, 897, 1931.

und zwar alle vier Carbinole nach der Reaktion von *Grignard*, durch Umsetzung der entsprechenden Alkyl-Magnesium-Bromide (mit Ausnahme des Methyl-Phenyl-Carbinols, bei dem Methyl-Jodid verwendet wurde) mit Benzaldehyd:

1. $R\,Hal + Mg = R\,Mg\,Hal$,
2. $R\,Mg\,Hal + C_6H_5CHO = C_6H_5CH\underset{R}{\overset{O\,Mg\,Hal}{-}}$,
   (*Grignard*-Zwischenverbindung)
3. $C_6H_5OH\underset{R}{\overset{O\,Mg\,Hal}{-}} + H_2O = C_6H_5CHOH\,R + Mg(OH)Hal$.

Die ersten drei Carbinole wurden außerdem noch durch Reduktion der entsprechenden Ketone mit Natrium und Alkohol dargestellt.

Wie aus der später folgenden Beschreibung der Versuche ersichtlich ist, brauchten wir für die fermentativen Syntheseansätze sehr große Mengen Äthyl-Phenyl-Carbinol und Propyl-Phenyl-Carbinol, um bei der fermentativen Veresterung nach der chemischen Aufarbeitung eine für die Bestimmung des Polarisationswertes und der Verseifungszahl genügend große Esterausbeute zu erhalten. Wir mußten daher die bei der Umsetzung der einfachen Alkyl-Halogenide an und für sich glatt verlaufende *Grignard*-Methode so ausbauen, daß wir ohne Schwierigkeiten bequem die für unsere Zwecke notwendigen großen Carbinolmengen erhalten konnten. Folgende technische Unbequemlichkeiten treten in der *Grignard*-Reaktion bei Umsetzung großer Mengen Magnesium in Erscheinung:

1. Bei der Darstellung der Alkyl-Magnesium-Halogenidverbindungen und in erhöhtem Maße bei der Darstellung der *Grignard*-Zwischenverbindung treten leicht Reaktionsverzüge auf, die auf unvollständiger Umsetzung des Magnesiums mit dem Alkyl-Halogenid bzw. des Alkyl-Halogenids mit der zweiten Komponente, in unseren Fällen dem Benzaldehyd, beruhen und ein plötzliches, außerordentlich heftiges, nicht mehr regulierbares Einsetzen der Reaktion zur Folge haben; diese Reaktionsverzüge sind nicht zu vermeiden, wenn nicht dauernd gut geschüttelt wird, was bei Verwendung größerer Flüssigkeitsmengen in großen Gefäßen nicht ganz einfach ist.

2. Die *Grignard*-Zwischenverbindung scheidet sich als halbkristalline Schmiere ab, die schnell zu einer festen, zähen Masse erstarrt und, vor allem beim Arbeiten mit größeren Mengen Magnesium, nur mit den größten Schwierigkeiten aus dem Reaktionsgefäß zur Zersetzung entfernt werden kann.

3. Bei der Aufarbeitung der *Grignard*-Ansätze nach der Zersetzung erhält man wegen der großen, zur Zersetzung notwendigen Eismengen große Flüssigkeitsvolumina, die unbequem handzuhaben sind.

Die beiden erstgenannten Übelstände werden in ausgezeichneter Weise vermieden, wenn man in das Reaktionsgefäß, wie weiter unten beschrieben wird, einen starken mechanischen Rührer mit Quecksilberverschluß einbaut. Reaktionsverzüge können unter diesen Umständen überhaupt nicht vorkommen, die gesamte Reaktion, Darstellung der Alkyl-Magnesium-Halogenidverbindung und der *Grignard*-Zwischenverbindung, ist sehr fein regulierbar und kann sich selbst überlassen werden. Das wichtigste Ergebnis dieser apparativen Anordnung jedoch ist, daß in allen Fällen, auch bei den niedrigen Homologen, die *Grignard*-Zwischenverbindung als kristallines Pulver ausfällt, das mit Leichtigkeit aus dem Kolben entfernt werden kann und durch die Zersetzungsmedien Eis – Schwefelsäure oder Eis – Ammonchlorid momentan angegriffen wird. Auch sehr große Ansätze können nach

dieser apparativen Anordnung mit Leichtigkeit durchgeführt werden; sie ist in allen Fällen zu empfehlen, bei denen mehr als 1 Mol Magnesium zur Umsetzung gebracht wird. Schon an dieser Stelle weisen wir auf folgende Beobachtung hin: Die *Grignard*-Zwischenverbindung fällt um so schöner kristallin aus, je höhere Homologe wir darstellen. Während die *Grignard*-Zwischenverbindungen bei der Darstellung des Propyl-Phenyl-Carbinols und des Butyl-Phenyl-Carbinols rein kristallin in ziemlich gut ausgebildeten Kristallen ausfallen, sind die *Grignard*-Zwischenverbindungen des Methyl-Phenyl-Carbinols sowie des Äthyl-Phenyl-Carbinols zwar ebenfalls kristallin, aber mit klebrigen Schmieren verunreinigt. Diese Tatsache, auf die wir bei der Besprechung unserer Versuchsergebnisse bei der fermentativen Estersynthese noch zurückkommen werden, ist für unsere kinetischen Resultate von Bedeutung.

Die Zersetzung der *Grignard*-Zwischenverbindung kann entweder in saurem Milieu (Eis-Schwefelsäure) oder im alkalischen Milieu mit Eis-Ammonchlorid vor sich gehen.

Die Zersetzung mit Eis-NH_4Cl geht bei -18^0 vor sich und ist schon deswegen milder als die saure; sie ist nach unseren Erfahrungen bei der Darstellung des Methyl-Phenyl-Carbinols, besonders wenn man es, wie in unserem Falle, über das Alkyl-Jodid darstellt, der sauren vorzuziehen; man vermeidet so die bei der sauren Zersetzung stets ziemlich rasch eintretende Gelbfärbung der Präparate, die auf der Oxydation der in geringer Menge bei der sauren Zersetzung entstehenden Jodwasserstoffsäure-ester des Carbinols durch den Luftsauerstoff beruht.

Bei der Darstellung der höheren Homologen ist die Art der Zersetzung der *Grignard*-Zwischenverbindungen ziemlich gleichgültig; wir haben sowohl mit NH_4Cl als auch mit H_2SO_4 zersetzt, ohne bemerkenswerte Unterschiede in der Qualität der Präparate und auch in der Kinetik bei der fermentativen Veresterung feststellen zu können. Wesentlich erscheint uns nun die Feststellung, daß man die Schwefelsäure nicht durch Salzsäure ersetzen darf. Geschieht dies, so erhält man wesentlich verringerte Ausbeute und schlechtere Präparate. Bei der Zersetzung mit Salzsäure bildet sich nämlich neben anderen Verbindungen momentan und in größeren Mengen der Chlorwasserstoffsäure-ester unserer Carbinole, und zwar besonders leicht bei den niederen Homologen; dieser Ester zerfällt äußerst leicht in Salzsäure und den entsprechenden ungesättigten Kohlenwasserstoff, der bei der Vakuumdestillation der Carbinole in den Vorlauf geht und sich dort durch momentanes Entfärben einer Bromlösung in Chloroform nachweisen läßt.

Anordnung der Apparatur. Ein je nach der Größe des Ansatzes zu wählender Rundkolben mit weitem Hals befindet sich in einem Wasserbad, das auf einer elektrischen Heizplatte steht. Der Kolbenhals ist durch einen dicht sitzenden großen, doppelt durchbohrten Korkstopfen verschlossen. Durch die eine Bohrung geht ein seitlich abgebogener Tropftrichter, durch die andere ein *Anschütz*-Aufsatz; der *Anschütz*-Aufsatz trägt einen Quecksilberverschluß, durch den ein starker Rührer geführt wird, der seinerseits mit dem Antriebsmotor verbunden ist. Der seitliche Ansatz des *Anschütz*-Rohres ist mit einem gut wirkenden Rückflußkühler verbunden, der durch ein Chlorcalcium-röhrchen verschlossen wird. Das Rührwerk wird von Beginn bis zum Ende der Reaktion in Betrieb gehalten.

Beschreibung eines großen *Grignard*-Ansatzes zur Darstellung von Äthyl-Phenyl-Carbinol:

In einem 3-Liter-Rundkolben werden 144 g Magnesium mit absolutem Äther überschichtet, einige Kristalle Jod zum besseren Angehen der Reaktion hinzugefügt und der Kolben mit der eben beschriebenen Apparatur verbunden. Das Rührwerk wird nun in Betrieb gesetzt und aus dem 500-ccm-Tropftrichter, in den nacheinander 700 g Bromäthyl, gelöst in 1500 ccm absolutem Äther, gefüllt werden, zunächst eine kleine Menge der Bromäthyllösung in den Kolben zum Magnesium gegeben. Man wartet nun, bis die Reaktion einsetzt, was meistens nach einigen Minuten erfolgt, und läßt dann allmählich, immer unter Rühren, die ganze Bromäthyllösung nachfließen. Der Zulauf der Bromäthyl-lösung wird so einreguliert, daß die Reaktion stets in gutem Tempo verläuft. Nach beendigter Zugabe wird die Reaktion noch eine Stunde sich selbst überlassen, hierbei gehen die letzten Reste Magnesium in Lösung. Nun wird das Wasserbad mit Eis gefüllt und, nach genügender Abkühlung der Äthyl-Magnesiumbromidlösung, zu dieser aus dem Tropftrichter allmählich, sehr langsam, tropfenweise und wieder unter dauernder Rührung, 654 g frisch destillierter Benzaldehyd in 500 ccm absolutem Äther hinzugegeben. Nach beendeter Zugabe der Benzaldehyd-lösung wird das Wasserbad angeheizt und der Kolben 1 bis 2 Stunden zum kräftigen Sieden des Äthers erwärmt. Dann läßt man abkühlen, gießt zunächst die im Kolben befindliche ätherische Lösung auf das Zersetzungsgemisch (Eis – 25%ige Schwefelsäure oder Eis – Ammonchlorid in gleichen Teilen), das sich in einem großen Filterstutzen befindet, und trägt dann allmählich unter sehr gutem Umrühren den gesamten festen Kolbeninhalt in kleinen Portionen in die Zersetzungsflüssigkeit ein. Die Zersetzung geht sehr schnell und unter bedeutender Wärmeentwicklung vor sich; durch ständiges Zufügen von viel Eis verhindert man ein Ansteigen der Temperatur. Das Carbinol geht in die ätherische Schicht. Man saugt durch Eintauchen eines Glasrohres, das an die Wasserstrahlpumpe geschlossen ist, den größten Teil der wässerigen Phase ab (Ausäthern bringt keine wesentliche Ausbeuteverbesserung mit sich), die zurückbleibende Ätherlösung sowie eine kleine Schicht noch nicht abgesaugter wässeriger Phase werden nun durch eine Porzellannutsche in eine große Saugflasche mit der Wasserstrahlpumpe filtriert, um nicht in Lösung gegangenes Magnesium-oxy-bromid, das viel ätherische Lösung eingeschlossen enthält und sich bekanntermaßen nur sehr schwierig filtrieren läßt, auf diese Weise bequem ohne Verluste an ätherischer Lösung abzutrennen. Erst jetzt, nachdem man klare Lösungen und schon stark reduzierte Flüssigkeitsvolumina hat, trennt man im Scheidetrichter die ätherische Lösung von den letzten Wassermengen. Die ätherische Lösung wird nun in großen Flaschen auf der Schüttelmaschine mit dem halben Volumen 40%iger Bisulfitlauge 15 Minuten geschüttelt, die ausgeschiedene Bisulfitverbindung des nicht umgesetzten Benzaldehyds wird abgenutscht, die Bisulfitlauge mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt, die ätherische Lösung nochmals mit Bisulfitlauge in derselben Weise und dann ebenso mit Sodalösung behandelt, und, nach Entfernen der letzten Reste Sodalösung im Scheidetrichter, über Calciumchlorid getrocknet. Das Calciumchlorid wird nach 12stündigem Stehen abgenutscht, mit Äther nachgewaschen, dann der Äther am Wasserbad verdampft und der Rückstand im Wasserstrahlpumpenvakuum destilliert. Bei wenig Vorlauf und etwas größeren Mengen höhersiedender Bestandteile erhielten wir eine Hauptfraktion von 715 g, d. i. 88% der Theorie.

Ganz analog geschah die Darstellung der übrigen Carbinole. Aus der großen Zahl der im Verlaufe dieser Arbeit verarbeiteten *Grignard*-Ansätze geben wir für jedes Carbinol ein Beispiel:

Methyl-Phenyl-Carbinol: 24 g Mg, 150 g Jodmethyl, gelöst in 200 ccm absolutem Äther, dazu 106 g Benzaldehyd in 100 ccm Äther. Ausbeute: 11 g, d. i. 88,5 % der Theorie.

Propyl-Phenyl-Carbinol: 177 g Mg, 1000 g Propylbromid in 1500 g Äther, dazu 880 g Benzaldehyd in 600 ccm Äther. Ausbeute: 950 g, d. i. 81 % der Theorie.

Butyl-Phenyl-Carbinol: 30 g Mg, 200 g n Butylbromid in 200 ccm Äther, dazu 130 g Benzaldehyd in 150 ccm Äther. Ausbeute: 177 g, d. i. 92 % der Theorie.

Wie bereits erwähnt, wurden die ersten drei Glieder der homologen Reihe unserer Carbinole, also Methyl-Phenyl-Carbinol, Äthyl-Phenyl-Carbinol und Propyl-Phenyl-Carbinol, außerdem noch durch Reduktion der entsprechenden Ketone dargestellt. Acetophenon und Äthyl-Phenyl-Keton wurden käuflich bezogen und nochmals destilliert. Propyl-Phenyl-Keton wurde nach der Methode von *Friedel-Krafft*s dargestellt.

Beschreibung der Darstellung von Methyl-Phenyl-Carbinol durch Reduktion von Acetophenon.

100 g Acetophenon werden in 1 Liter Äthylalkohol gelöst. Der $2^1/_2$ Liter fassende Reaktionsrundkolben trägt einen *Anschütz*-Aufsatz mit Rückflußkühler am seitlichen Ansatz. Durch das gerade Rohr des *Anschütz*-Aufsatzes werden nun ziemlich rasch 100 g Natrium in kleinen Stückchen in den Kolben geworfen. Sobald sich das Natrium gelöst hat, was sehr bald nach beendigter Zugabe erfolgt ist, wird sofort, bevor das Reaktionsgemisch durch das beim Erkalten sich ausscheidende Natriumäthylat erstarrt ist, ein kräftiger Strom Kohlendioxyd durch die Lösung geleitet. Nach einer Weile, wenn auch die letzten Spuren von metallischem Natrium verschwunden sind, wird mit 300 ccm Wasser verdünnt, weiter Kohlendioxyd eingeleitet, nochmals mit 300 ccm Wasser verdünnt und nach Beendigung der Natriumcarbonatausscheidung dieses abgesaugt und mit Alkohol gewaschen. Dann werden Alkohol und Wasser im Vakuum am Wasserbad abdestilliert. Es hinterbleibt ein viskoses, braunes Öl, das in Äther aufgenommen, mit Bisulfitlauge und Sodalösung gut durchgeschüttelt und über Chlorcalcium getrocknet wird. Nach Abdampfen des Äthers am Wasserbad wird das Öl im Vakuum fraktioniert. Das Carbinol geht fast ohne Vorlauf beim richtigen Siedepunkt vollkommen konstant über. Es hinterbleibt eine große Menge sehr hochsiedender Harze. Ausbeute 40 bis 50 % der Theorie.

Darstellung von Äthyl-Phenyl-Carbinol aus Äthyl-Phenyl-Keton: 150 g Äthyl-Phenyl-Keton werden in 1,5 Liter Äthylalkohol gelöst und mit 150 g Natrium reduziert. Weitere Aufarbeitung wie oben. Ausbeute 40 % der Theorie.

Darstellung von Propyl-Phenyl-Carbinol aus Propyl-Phenyl-Keton: 135 g Propyl-Phenyl-Keton werden mit 10 g Natrium reduziert. Weitere Aufarbeitung wie oben. Ausbeute etwa 70 % der Theorie.

Darstellung des Propyl-Phenyl-Ketons nach *Friedel-Krafft*s: 300 g wasserfreies Aluminiumchlorid werden in einem 2 Liter Rundkolben mit engem Hals und Rückflußkühler mit Schwefelkohlenstoff überschichtet.

Dann wurde bei gewöhnlicher Temperatur unter häufigem Umschütteln eine Lösung von 300 g Butyrylchlorid in 300 ccm Benzol in kleineren Mengen eingetragen. Bei energischer Reaktion dauerte die Eintragung $^3/_4$ Stunde, die Reaktion wurde dann noch $^1/_2$ Stunde sich selbst überlassen und dann abgebrochen, ohne daß ihr Ende abgewartet wurde, da sonst Verharzung eintritt. Die Reaktionsmasse wurde in verdünnte Salzsäure gegossen, ausgeäthert, die ätherische Lösung wiederholt mit salzsäurehaltigem und zum Schluß mit natriumcarbonathaltigem Wasser gewaschen und dann über Calciumchlorid getrocknet. Der Rückstand nach Abdampfen des Äthers am Wasserbad wurde dreimal im Vakuum destilliert. Das Keton geht völlig farblos bei 132°/14 mm Hg über. Ausbeute 115 g, 35% der Theorie.

Wir können die Angabe *Piccards* und *Kenyons*[1] bestätigen, die angeben, daß die aus den Ketonen gewonnenen Carbinole reiner sind als die nach *Grignard* dargestellten. Die Carbinole gehen bei der Destillation absolut konstant innerhalb zweier Grade über und erhalten auch nach monatelangem Stehen nicht den leichten Stich ins Gelbe, wie die Carbinole *Grignards* nach längerer Aufbewahrung ihn immer zeigen. In den Siedepunkten und spezifischen Gewichten ist bei beiden Darstellungsmethoden kein Unterschied festzustellen.

Tabelle I.

Übersicht über die Konstanten der Carbinole.

	Siedepunkt	Spez. Gew.
Methyl-Phenyl-Carbinol nach *Grignard* . . .	99—102°/15 mm	1,013
„ „ „ aus Acetophenon . .	99°/15 mm	1,013
Äthyl-Phenyl-Carbinol nach *Grignard* . . .	100—103°/13 mm	0,994
„ „ „ aus Äthyl-Phenyl-Keton	102—103°/13 „	0,9839
Propyl-Phenyl-Carbinol nach *Grignard* . . .	106—109°/12 „	0,9746
„ „ „ aus Phenyl-Propyl-Keton	106—107°/12 „	0,9737
Butyl-Phenyl-Carbinol nach *Grignard* . . .	139—145°/14 „	0,9601

2. Darstellung der Ester.

Die Ester lassen sich nach der gewöhnlichen *Fischer*schen Methode durch Einleiten von Salzsäuregas in eine Lösung der zu veresternden Säure im Carbinol nicht darstellen, da hierbei in quantitativer Ausbeute die Chlorwasserstoffsäureester entstehen. Verwendet man an Stelle von Salzsäuregas konzentrierte Schwefelsäure, so entstehen die entsprechenden ungesättigten Kohlenwasserstoffe. Man erhält dagegen die Ester in sehr guter Ausbeute, wenn man zum Carbinol eine Lösung des Säurechlorids in Pyridin langsam unter guter Kühlung hinzufließen läßt. Wir haben auf diese Weise die Buttersäureester der vier Carbinole dargestellt. Das zur Reaktion erforderliche Butyrylchlorid haben wir selbst aus dem käuflichen Präparat „Buttersäure normal *Kahlbaum*" hergestellt, das eine synthetisch gewonnene und

[1] J. of the Chem. Soc. **33**, 45, 1911.

absolut von iso-Buttersäure sowie von höheren und niederen Homologen freie Säure darstellt.

Darstellung von Butyrylchlorid: In einem Kolben mit eingeschliffenen Rückflußkühler wird ein Gemisch von 200 g Buttersäure und 175 g Phosphortrichlorid 6 Stunden im Ölbad auf einer Temperatur von 50 bis 60° gehalten. Nach Beendigung der Reaktion wird der Kolben durch einen eingeschliffenen Destillationsaufsatz mit einem ebenfalls eingeschliffenen absteigenden Kühler verbunden, und zunächst das nicht umgesetzte Phosphortrichlorid, dann das gebildete Butyrylchlorid von der phosphorigen Säure abdestilliert. Die Fraktion zwischen 95 und 103° wird gesondert aufgefangen und zweimal destilliert. Siedepunkt des Butyrylchlorids 100 bis 103°.

Alle Ester wurden nach gleichem, im folgenden beschriebenen Verfahren dargestellt: Zum Carbinol wurde ein Gemisch von Butyrylchlorid und Pyridin (beide Komponenten in 10%igem Überschuß) tropfenweise, sehr langsam und unter starkem Schütteln gegeben. Da die Reaktion sehr heftig unter starker Erwärmung vor sich geht, ist das Reaktionsgefäß dauernd gut mit Eis zu kühlen, und es muß sehr langsam gearbeitet werden. Nach Beendigung der Zugabe des Butyrylchlorid-Pyridin-Gemisches läßt man die Reaktionsmasse einige Stunden bei Zimmertemperatur stehen. Dann gießt man in schwefelsäure-haltiges Wasser, ätherт aus, wäscht die ätherische Lösung vier- bis fünfmal mit schwefelsäurehaltigem Wasser, dann zum Schluß mit Sodalösung und trocknet über Calciumchlorid. Dann wird vom Calciumchlorid abzentrifugiert, der Äther am Wasserbad verdampft und der Rückstand im Vakuum fraktioniert. Man erhält einen Vorlauf, der aus ungesättigtem Kohlenwasserstoff und nicht umgesetzten Carbinol besteht. Ausbeute 60 bis 70% der Theorie. Wir geben wieder ein Beispiel für die Darstellung eines jeden Esters:

1. Methyl-Phenyl-Carbinyl-Buttersäure-Ester. Zu 22 g Methyl-Phenyl-Carbinol ein Gemisch von 22 g Butyrylchlorid und 16 g Pyridin. Ausbeute 24,6 g, d. i. 71% der Theorie.

2. Äthyl-Phenyl-Carbinyl-Buttersäure-Ester. Zu 136 g Äthyl-Phenyl-Carbinol ein Gemisch von 116 g Butyrylchlorid und 100 g Pyridin. Ausbeute 135 g, d. i. 65% der Theorie.

3. Propyl-Phenyl-Carbinyl-Buttersäure-Ester. Zu 30 g Propyl-Phenyl-Carbinol ein Gemisch von 22 g Butyrylchlorid und 18 g Pyridin. Ausbeute 23,8 g, d. i. 54% der Theorie.

4. Butyl-Phenyl-Carbinyl-Buttersäure-Ester. Zu 30 g Butyl-Phenyl-Carbinol ein Gemisch von 20 g Butyrylchlorid und 20 g Pyridin. Ausbeute 22 g, d. i. 50,9% der Theorie

Bei der fermentativen Hydrolyse unserer Ester konnten wir auf Grund gewisser Beobachtungen die Feststellung machen, daß diese das Bestreben haben, in Buttersäure und den entsprechenden ungesättigten Kohlenwasserstoff spontan zu zerfallen, z. B. der Buttersäureester des Äthyl-Phenyl-Carbinols, an dem wir die meisten Spaltungen ausführten, nach der Gleichung

$$\begin{array}{l} C_6H_5 . CH . CH_2 . CH_3 \\ \quad\quad | \\ \quad\quad O . OC . CH_2 . CH_2 . CH_3 \end{array} \longrightarrow \begin{array}{l} C_6H_5 . CH = CH . CH_3 \\ + CH_3 . CH_2 . CH_2 . COOH \end{array}$$

und zwar steigt diese Zerfallsneigung mit zunehmender C-Zahl in der homologen Reihe. Läßt man frisch destillierten Äthyl-Phenyl-Carbinyl-Buttersäure-Ester, der einen Siedepunkt von 122 bis 127°/12 mm Hg hat,

ungefähr 1 Woche stehen und destilliert dann wieder, so erhält man jetzt beträchtliche Mengen eines Vorlaufes, der bei 78°/12 mm Hg siedet und Bromlösung in Chloroform entfärbt. Wir haben aus diesem Vorlauf die Dibromid-Anlagerungsverbindung des ungesättigten Kohlenwasserstoffs isoliert, sie hat einen Schmelzpunkt von 67° und ist das α, α-Dibromäthyl-Benzol. Die Buttersäureester des Propyl-Phenyl-Carbinols und noch stärker die des Butyl-Phenyl-Carbinols zersetzen sich schon bei langsamer Destillation, was am Absinken des Siedepunktes deutlich beobachtet werden kann; sie entfärben Bromlösung und sind auch bei mehrmaliger Destillation nicht frei von ungesättigtem Kohlenwasserstoff zu bekommen. Für Fermentspaltungsversuche sind diese beiden Ester daher ungeeignet.

Ester-Konstanten.

Bezeichnung der Ester	Siedepunkt	Spez. Gew.	Aus der Verseifungszahl berechneter %-Gehalt an Ester
Methyl-Phenyl-Carbinyl-Buttersäureester . . .	119—123°/14 mm Hg	0,9805	100,25
Äthyl-Phenyl-Carbinyl-Buttersäureester . . .	122—127°/12 „ Hg	0,9711	100,19
Propyl-Phenyl-Carbinyl-Buttersäureester . . .	130—140°/14 „ Hg	0,9687	100,58
Butyl-Phenyl-Carbinyl-Buttersäureester . . .	139—145°/13 „ Hg	0,9527	100,84

Darstellung des Mandelsäure-sec. Butylesters: Wir brauchten diesen Ester für einige Versuche und geben kurz seine Darstellung. In eine Lösung von 50 g Mandelsäure in 80 g destilliertem käuflichen sekundären Butylalkohol leiteten wir 15 g Chlorwasserstoff ein und kochten $4^1/_2$ Stunden am Rückflußkühler. Nach Beendigung der Veresterung dampften wir den überschüssigen Butylalkohol im Vakuum ab, neutralisierten mit Bicarbonatlösung, ätherten aus, wuschen die ätherische Lösung wiederholt mit Bicarbonatlösung und trockneten dann über wasserfreiem Natriumsulfat. Nach Filtration des Natriumsulfats fraktionierten wir im Vakuum. Der Ester destillierte ohne Vorlauf bei 136 bis 137°/10 mm Hg.

3. Fermentmaterial.

Für die Synthese wurde selbst dargestelltes Schweine-Pankreas-Aceton-Äther-Trockenpulver, für die Hydrolyse ein nach der bekannten Weise bereiteter $^1/_{40}$ n ammoniakalischer Extrakt aus ebenfalls selbst hergestelltem Schweine-Leber-Aceton-Äther-Trockenpulver verwendet.

4. Beschreibung der Syntheseansätze und ihrer chemischen Aufarbeitung zur Gewinnung des durch das Ferment gebildeten Esters.

In mit ausgekochten Gummistopfen zu verschließende Flaschen, deren Größe entsprechend der Größe des Syntheseansatzes gewählt wird, wird das zu veresternde Carbinol, Buttersäure (synthetisch normal *Kahlbaum*) und Wasser in den bei der Zusammenstellung der Synthese-Versuchsergebnisse angegebenen Mengen hineinpipettiert. Dann wiegt man auf der Handwaage das Fermentpulver ab, gibt es in die Flaschen zu den Syntheseansätzen.

schüttelt mit der Hand einige Minuten kräftig durch, gießt dann aus jeder Flasche etwa 3 ccm in kleine Zentrifugengläser und befestigt die Flaschen in geeigneter Weise in einer Schüttelmaschine, die sich in einem Brutschrank befindet, der auf einer Temperatur von 32° gehalten wird. Während nun die fermentative Veresterung auf der Schüttelmaschine vor sich geht, zentrifugiert man die Abnahmen in den Zentrifugengläschen einige Minuten, wobei das Fermentpulver sedimentiert, und pipettiert dann von der klaren überstehenden Lösung einen aliquoten Teil (wir nahmen meistens 2 ccm) in einen kleinen Erlenmeyerkolben. Man verdünnt nun mit ungefähr 50 ccm Alkohol, gibt einige Tropfen einer 4‰igen alkoholischen Brom-Thymolblaulösung als Indikator hinzu und titriert gegen eingestellte Natronlauge (bei unseren Versuchen meistens n/10). In gewissen Zeitintervallen werden in gleicher Weise Abnahmen gemacht und die Titrationswerte der abpipettierten, immer gleichen Mengen ermittelt. Der durch die Titration angezeigte Säureschwund ist das Maß für den Grad der Synthese. Bei den Abnahmen muß möglichst rasch gearbeitet werden, damit die Synthese beim Herausnehmen der Flaschen aus der Schüttelmaschine nicht zu lange unterbrochen wird.

Ist nun der gewünschte Synthesegrad erreicht, so werden die Ansätze aus dem Brutschrank genommen und möglichst schnell vom Fermentpulver abzentrifigiert.

Hierdurch wird die Synthese gestoppt, da in unseren Fällen eine Eigenveresterung der Carbinole mit der Buttersäure nicht vorhanden ist. Die überstehende klare Lösung wird in einen Scheidetrichter gegossen und das sedimentierte Ferment auf der Zentrifuge mehrere Male mit Äther gründlich gewaschen. Die ätherischen Lösungen werden nun mit der im Scheidetrichter befindlichen Hauptlösung vereinigt und im Scheidetrichter zur Entfernung der nicht veresterten Buttersäure mehrere Male gründlich mit Sodalösung durchgeschüttelt. Die hierbei auftretenden Emulsionen verschwinden bald; man wartet mit dem Ablassen der Sodalösungen, bis vollständige Entmischung der beiden Flüssigkeitsschichten eingetreten ist (Verseifungsgefahr ist hierbei nicht zu befürchten, da die gebildeten Ester ziemlich alkaliresistent sind) und trocknet die ätherische Schicht über Calciumchlorid. Nach einigen Stunden wird das Calciumchlorid abfiltriert und gründlich mit Äther gewaschen, dann wird der Äther am Wasserbad abdestilliert und die zurückbleibende Flüssigkeit zunächst in einem größeren *Claisen*-Kolben im Vakuum fraktioniert. Es geht zuerst das Carbinol über. Da bei den Syntheseansätzen mit großem Carbinolüberschuß gearbeitet wird und nur geringe Estermengen entstehen, destilliert man in dem größeren Kolben zunächst den größeren Teil des Carbinols ab; dann, wenn sich im Kolben nur noch ungefähr 15 ccm Flüssigkeit befinden, unterbricht man die Destillation und spült die restlich gebliebene Flüssigkeitsmenge mit Äther quantitativ in einen *Claisen*-Kolben von etwa 30 ccm Inhalt. Bei der nun folgenden zweiten Fraktionierung fängt man als „Esterfraktion" beim Äthyl-Phenyl-Carbinol die bei 112 bis 125°/13 mm Hg übergehenden Bestandteile (Siedepunkt des reinen Esters 122 bis 125°), beim Propyl-Phenyl-Carbinol die bei 115 bis 129°/13 mm Hg siedenden Anteile auf. Diese Fraktionen enthalten Gemische von Carbinol und Ester, deren Gehalt an Ester durch Bestimmung der Verseifungszahl (siehe weiter unten) ermittelt wird. Die wichtigste Bedingung für das Gelingen dieser nicht ganz einfachen Aufarbeitung ist absolut quantitatives Arbeiten in allen Stadien; man erhält sonst nicht die für die Polarisation notwendigen Mengen an

Esterfraktion. Auch bei sorgfältigstem Arbeiten muß man mit einem Verlust des durch das Ferment gebildeten Esters von 40 bis 50 % rechnen, hauptsächlich, weil bei der Fraktionierung erhebliche Estermengen mit dem Carbinol im eutektischen Gemisch übergehen. Hieraus ergibt sich, daß man die Ansätze recht groß wählen muß, um zu Resultaten zu gelangen. Die von uns weiter unten angegebenen Mengen bei den Syntheseansätzen sind das Minimum des Möglichen, ihre erfolgreiche Aufarbeitung setzt bereits ein gewisses Maß an Übung voraus.

5. Beschreibung der fermentativen Hydrolyseansätze und ihrer chemischen Aufarbeitung.

Die Verfolgung der hydrolytischen Spaltung unserer Ester durch das Ferment geschah nach dem Prinzip der Methode von *Knaffl-Lenz* durch jeweilige Neutralisation der durch das Ferment in Freiheit gesetzten Buttersäure mit eingestellter Natronlauge. Als Indikator gaben wir zu den Ansätzen wenige Tropfen einer $4^0/_{00}$igen Bromthymolblaulösung[1] und hielten durch ständige Zugabe von Natronlauge die Reaktion immer auf den grünen Farbton des Indikators, der ungefähr einem p_H von 7,6 entspricht. Unsere Apparatur bestand aus einem Thermostaten, in dem ein mechanischer Rührmechanismus so eingebaut war, daß durch eine Übertragung vier in Erlenmeyern befindliche Hydrolyseansätze gleichzeitig gut durchgerührt werden konnten. Die *Erlenmeyer*-Kolben waren an eingebaute Stative angeklammert; jedes dieser Stative trug außerdem je eine Bürette, deren verlängerte Spitze in den Hals des *Erlenmeyer*-Kolbens hineinragte. Die Hydrolyse ging bei 37° vor sich. Nach je 15 Minuten wurden die Büretten-stände notiert.

Nach Erreichung des gewünschten Spaltungsgrades wird die fermentative Hydrolyse durch Zugabe von etwa 50 ccm Äther gestoppt. (Eine bemerkbare Eigenhydrolyse haben unsere Ester nicht.) Die Hydrolysenflüssigkeit wird dann im Scheidetrichter mit Äther gut durchgeschüttelt; hierbei bilden sich stark schäumende Emulsionen. Um Entmischung der Flüssigkeitsschichten herbeizuführen, werden einige Kubikzentimeter Alkohol hinzugesetzt, der die Emulsion sowie den Schaum größtenteils zerstört. Die Ausätherung wird wiederholt, und die vereinigten Ätherauszüge werden über Natriumsulfat getrocknet. Nach einigen Stunden wird das Natriumsulfat abfiltriert, mit Äther gewaschen und dann der gesamte Äther und Alkohol am Wasserbad möglichst weitgehend abdestilliert. Soll nun der durch das Ferment nicht gespaltene Ester wiedergewonnen werden, so fügt man zu der nach dem Abdampfen des Äthers zurückbleibenden Lösung 10 bis 15 ccm synthetisch dargestelltes d, l-Carbinol hinzu. Durch diese Zugabe erreichen wir eine derartige Verdünnung des bei der fermentativen Hydrolyse entstandenen optisch-aktiven Carbinols, daß wir eine Beeinflussung der entgegengesetzten Drehung des Esters durch dies Carbinol nach dem Abdestillieren nicht zu befürchten brauchen.

Sodann wird wieder fraktioniert. Bei der Destillation im Vakuum erhalten wir als Esterfraktion wieder ein Gemisch von Ester und Carbinol, dessen Estergehalt durch die Verseifungszahl zu bestimmen ist.

[1] Vgl. hierzu *Bamann*, Zeitschr. physiol. Chem. **194**, 1, 1931.

6. Bestimmung der Verseifungszahlen.

Ungefähr 0,6 g des Esters oder der Esterfraktionen werden auf der analytischen Waage in einen Rundkolben von etwa 100 ccm Inhalt eingewogen. Dann werden 50 ccm n/10 Natronlauge und 20 ccm Äthylalkohol in den Kolben pipettiert und der Kolbeninhalt 3 Stunden auf dem Wasserbad am Rückflußkühler gekocht. Dann wird mit einigen Tropfen Bromthymolblaulösung versetzt und gegen n/10 Schwefelsäure zurücktitriert.

7. Bestimmung der Polarisationswerte.

Die Polarisationen wurden bei Zimmertemperatur bei Natriumlicht in einem 1-dm-Polarisationsrohr ausgeführt, das einen Inhalt von etwa 1 ccm Flüssigkeit faßte.

Versuche.

Wir beginnen mit der Darstellung unserer experimentellen Befunde bei der fermentativen *Synthese*. Die Synthesen wurden mit Schweine-Pankreas-Organtrockenpulver durchgeführt, und zwar sämtliche Versuche mit ein und demselben Fermentpräparat.

Tabelle I a.

Verlauf der fermentativen Veresterung der verschiedenen Carbinole (die Zahlen bedeuten den prozentualen Synthesegrad der angewandten Buttersäure).

Zeit	1		2			3			4
Std.	a	b	a	b	c	a	b	c	
1			10,9	3,3		24,1	10		
2			19,1	9,3		34,0	18,8		
3			29,3	12,0		—	30		
4			44,9	24,0		52,6	39,9		
5			—	—		—	—		8
6			—	—		—	—		
7			—	—		—	—		
8			47,6	29,0		—	47,5		
14			—	—		57,3	—		
24	23,3	4,5	52,3	40,0	7,07	59,3	50,0	6	
48	29,3	5,0	53,0	40,0	—	59,5	50,5	—	28,0

Alle Ansätze wurden in folgenden Mengenverhältnissen zusammengestellt:

Carbinol	25	ccm
Buttersäure	2	„
Wasser	0,5	„
Ferment	0,6	g

Erläuterung zur Tabelle Ia:

Die einzelnen Spalten enthalten die verschiedenen Carbinole, die fermentativ mit Buttersäure verestert wurden, und zwar

Spalte 1a: Methyl-Phenyl-Carbinol, dargestellt nach *Grignard*
„ 1b: Methyl-Phenyl-Carbinol, dargestellt aus Acetophenon
„ 2a: Äthyl-Phenyl-Carbinol, nach *Grignard* ohne Rührung
„ 2b: Äthyl-Phenyl-Carbinol, nach *Grignard* mit Rührung
„ 2c: Äthyl-Phenyl-Carbinol, aus Äthyl-Phenyl-Keton
„ 3a: Propyl-Phenyl-Carbinol, nach *Grignard* ohne Rührung
„ 3b: Propyl-Phenyl-Carbinol, nach *Grignard* mit Rührung
„ 3c: Propyl-Phenyl-Carbinol, aus Propyl-Phenyl-Keton
„ 4: Butyl-Phenyl-Carbinol, nach *Grignard*

Alle Carbinole wurden für die Synthese-Ansätze zweimal destilliert.

Aus dieser Tabelle ergeben sich auffallende Unterschiede in der Veresterungs-Geschwindigkeit gleicher Carbinole, die sich nur durch gewisse Modifizierungen in der Darstellungsweise unterscheiden.

Vergleichen wir zunächst Spalte 2a mit 2b und 3a mit 3b. Die Substrate waren in 2a und 2b Äthyl-Phenyl-Carbinol, in 3a und 3b Propyl-Phenyl-Carbinol; beide Carbinole wurden nach *Grignard* dargestellt, und zwar waren 2a und 3a Ansätze, bei denen aus bestimmten Gründen während der Darstellung nicht gerührt wurde, während bei der Darstellung von 2b und 3b das beschriebene mechanische Rührwerk mit Quecksilberverschluß verwendet wurde.

Wir sehen, daß 1. bei nicht gerührten Ansätzen der Anstieg der Synthese ein steilerer ist als bei gerührten; 2. die Endgleichgewichte bei beiden Ansätzen verschieden sind: bei den gerührten Ansätzen stellt sich das Gleichgewicht der Esterbildung bei einem geringeren Synthesegrad ein als bei nicht gerührten; 3. die Unterschiede in der Kinetik beim Äthyl-Phenyl-Carbinol stärker zum Ausdruck kommen als beim Propyl-Phenyl-Carbinol.

Über die Erklärungsmöglichkeit dieses Befundes sei Näheres im theoretischen Teil gesagt.

Bereits im präparativen Teil haben wir darauf hingewiesen, daß die *Grignard*-Zwischenverbindungen bei der Darstellung ohne mechanische Rührung schmierig ausfallen und sehr bald zu einer zähen, festen Masse erstarren, während bei Verwendung eines Rührwerkes die *Grignard*-Zwischenverbindungen kristallin als lockeres Pulver erhalten werden. Es wurde auch bereits auf die Unterschiede in den Eigenschaften der verschiedenen *Grignard*-Zwischenverbindungen hingewiesen, deren Reinheit mit steigender C-Zahl in der homologen Reihe zunimmt.

Nun geht entsprechend der verschiedenen Konsistenz der verschiedenen *Grignard*-Zwischenverbindungen auch die Zersetzung verschieden vor sich: die festen, zähen Massen bei der Darstellung ohne Rührwerk lösen sich bei der Zersetzung sehr langsam, ein Teil, die schnell verharzenden Verunreinigungen, löst sich überhaupt nicht, während die lockere kristalline Masse bei der Darstellung mit Rührwerk momentan und vollständig in

Lösung geht. Die Carbinole aus den Darstellungen ohne Rührwerk sind daher sicher reiner als die unter Rührung dargestellten; deswegen werden sie auch durchweg durch das Ferment besser synthetisiert. Daß bei dem Propyl-Phenyl-Carbinol die Unterschiede der gerührten und nicht gerührten Präparate in der fermentativen Veresterung nicht so stark sind als beim Äthyl-Phenyl-Carbinol, findet seine Erklärung darin, daß die *Grignard*-Zwischenverbindungen bei der Darstellung des Propyl-Phenyl-Carbinols, wie bereits erwähnt, an und für sich reiner sind als die bei der Darstellung der niederen Homologen.

Bei diesen die Synthese beeinflussenden Fremdkörpern handelt es sich natürlich immer nur um spurenweis auftretende Verunreinigungen. Die hemmenden Körper lassen sich durch wiederholte Destillation der Carbinole von diesen nicht trennen, ein fünfmal destilliertes Präparat verhält sich genau so wie das zweimal destillierte. Wir prüften noch, ob Quecksilber, das in Spuren vielleicht beim Rühren aus dem Quecksilberverschluß in das Reaktionsgefäß hätte hineinkommen können, oder organische Quecksilberverbindungen die fermentative Synthese beeinflussen; es ist ja bekannt, daß Quecksilber auf manche fermentative Prozesse, wie z. B. auf die ureatische Wirkung, einen starken Einfluß haben kann. Wir setzten daher zu unseren Ansätzen metallisches Quecksilber sowie Quecksilber-bi-Phenyl hinzu, ohne indessen einen Einfluß dieser beiden Stoffe auf die fermentative Ester-Synthese feststellen zu können.

Die eigentümlichen Befunde veranlaßten uns nun, die Carbinole auf eine andere Art darzustellen, um vielleicht zu reineren Präparaten zu gelangen, jedenfalls aber die bei der *Grignard*-Reaktion auftretenden Verunreinigungen auszuschließen. Wir wählten die Darstellung der Carbinole durch Reduktion der Ketone. Wie ebenfalls bereits im präparativen Teil erwähnt, scheinen die Carbinole, die auf diese Art dargestellt sind, reiner zu sein als die nach *Grignard* dargestellten; auch *Piccard* und *Kenyon* haben bei ihren Carbinolen dieselbe Beobachtung gemacht.

Es stellte sich aber heraus, daß diese Präparate überhaupt nicht, oder doch nur zu einem verschwindend geringen Teil durch das Ferment verestert werden. Die Versuchsergebnisse sind in Spalte 1b, 2c und 3c eingetragen. Die für diese Beobachtung möglichen Erklärungen sowie die sich hieraus ergebenden theoretischen Folgerungen werden im theoretischen Teil zusammengefaßt.

Ferner wurden die Synthesekurven der einzelnen Homologen verglichen, und zwar wurden Präparate gewählt, die auf gleiche Art dargestellt worden sind, also die in den Spalten 1a, 2b, 3b und 4 eingetragenen Carbinole. Bei aller Vorsicht, mit der, wie sich aus unseren späteren Ausführungen ergibt, Vergleiche verschiedener Substrate miteinander in bezug auf ihre Reaktionskinetik bei fermentativen Vorgängen ausgeführt werden müssen, kann man doch aussagen, daß das Propyl-Phenyl-Carbinol von den Gliedern der homologen Reihe am besten durch das Ferment mit Buttersäure verestert wird.

Tabelle II.

Fermentative Veresterung von Äthyl-Phenyl-Carbinol bei Variation des Wasserzusatzes, des Ferments und der Buttersäurekonzentration. (Die Zahlen geben den Synthesegrad der angewandten Buttersäure in Prozenten an.)

	Ansätze			
	1	2	3	4
Carbinol, ccm	25	25	25	25
Säure, ccm	2	2	2	1
Wasser, ccm	0,5	—	0,5	0,5
Ferment, g	0,6	0,6	2	0,6
1 Std.	10,9	3,2	—	19,9
2 „	19,1	7,1	—	26,1
3 „	29,3	10,3	—	31,8
4,5 „	44,9	10,3	—	43,1
5,25 „	—	—	—	44,5
8,5 „	47,6	14,8	—	—
24 „	52,3	56,8	—	54,0
48 „	53,0	76,1	10,8	—

Erläuterungen zu Tabelle II:

Ansatz 1: Normaler Ansatz, Carbinol nach *Grignard*, nicht gerührt,

„ 2: Der gleiche Ansatz ohne Wasser,

„ 3: Der gleiche Ansatz mit Schweine-Leberpulver als Ferment,

„ 4: Carbinol nach *Grignard*, gerührt; Buttersäurekonzentration auf die Hälfte herabgesetzt.

Aus dieser Tabelle ergibt sich folgendes:

1. Synthetisiert man in wasserfreiem Milieu (abgesehen von dem geringen Wassergehalt des Fermentpräparats selbst), so geht die Synthese bedeutend langsamer vor sich, führt jedoch nach längerer Zeit zu einem weitergehenden Synthesegrad. Die bessere Esterbildung in diesem Falle ist verständlich, da ja nach dem Massenwirkungsgesetz Wasserzusatz das Gleichgewicht nach der Richtung der Hydrolyse hin beeinflußt. Die schnellere Anfangssynthese bei Gegenwart von Wasser führen wir auf einen besseren Verteilungszustand des Ferments in diesem Milieu zurück.

2. Die Synthesekinetik ist von der angewandten Säurekonzentration abhängig. Wir erzielen bei einem Präparat aus einem gerührten Ansatz, das an und für sich schlecht synthetisiert wird (siehe Tabelle I, 2b), bei Herabsetzung der Säurekonzentration auf die Hälfte der sonst angewandten eine bessere Synthese als bei unserem bestsynthetisierenden

Äthyl-Phenyl-Carbinol aus nicht gerührtem Ansatz. Eine Aktivitäts-P_s-Kurve, die bei unseren Substraten sehr leicht durchzuführen wäre, wurde nicht aufgestellt, weil sehr große Mengen des relativ kostbaren Materials hätten zur Verwendung gelangen müssen, und die prinzipielle Möglichkeit der Aufstellung von Aktivitäts-P_s-Kurven bei der fermentativen Estersynthese kürzlich in einer Arbeit von *P. Rona, R. Ammon* und *H. Fischgold*[1] dargelegt worden war.

3. Schweineleberpulver synthetisiert unsere Substrate überhaupt nicht, wenn es in gleicher Menge wie Pankreaspulver zum Syntheseansatz hinzugegeben wird; bei größeren Leberpulverzusätzen erhalten wir nach 48 Stunden eine schwache Synthese. Überhaupt kann man nach den allgemeinen bisher über die fermentative Estersynthese vorliegenden Erfahrungen aussagen, daß Lebertrockenpulver in den meisten Fällen sehr schlecht synthetisiert.

Tabelle III.

Abhängigkeit der optischen Auswahl vom Synthesegrad („Optische Auswahlkurve"). Substrat: dl-Äthyl-Phenyl-Carbinol.

	Ansätze						
Nr.:	1	2	3	4	5	6	7
Carbinol, ccm . .	232	150	75	75	75	75	75
Säure, ccm . . .	18,5	12	6	6	6	6	6
Wasser, ccm . .	4,5	3	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
Ferment, g . . .	5,4	3,6	1,5	1,5	1,5 + 1,5*	1,5 + 1,5*	1,5 + 1,5*
Anfangstitrationswerte ccm n/10 NaOH	16,5	15,5	15,5	15,5	15,3	15,2	16,4

Ansätze Nr.	Verschwundene ccm n/10 NaOH	Synthesegrad in %	Gefundenes α des fermentativ gebildeten Esters, „Esterfraktion"	Einwaage für Verseifung in g	Für die Verseifung verbrauchten ccm n/10 NaOH	Für die Verseifung berechneten ccm n/10 NaOH	% Gehalt der Esterfraktion an Ester	Berechnetes $[\alpha]_D$
1	1,9	12,25	+ 0,86°	0,7608	12,0	36,76	32,65	+ 2,58°
2	3,7	21,09	+ 0,75°	0,8562	14,0	41,36	33,85	+ 3,09°
3	3,3	19,88	+ 1,58°	0,5678	14,0	27,43	51,04	+ 2,21°
4	4,8	30,97	+ 1,56°	0,6064	14,1	29,00	48,62	+ 3,22°
5	7,4	48,36	+ 6,94°	0,6780	18,2	32,75	56,08	+ 14,90°
6	8,4	55,00	+ 17,94°	1,0188	24,7	49,23	50,18	+ 35,45°
7	11,4	69,52	+ 17,01°	0,7104	19,15	34,31	55,75	+ 30,52°

* Zu diesen Ansätzen wurde neues Fermentpulver nach 24-stündigem Stehen neu hinzugesetzt, daher also 1,5 + 1,5.

[1] Diese Zeitschr. **241**, 460, 1931.

Tabelle IV.

Abhängigkeit der optischen Auswahl vom Synthesegrad („Optische Auswahlkurve"). Substrat: dl-Propyl-Phenyl-Carbinol.

	Ansätze				
Nr.:	1	2	3	4	5
Carbinol, ccm	225	150	75	75	75
Säure, ccm	18	12	6	6	6
Wasser, ccm	4,5	3	1,5	1,5	1,5
Ferment, g	5,4	3,6	1,8	1,8 + 1,8*	1,8 + 1,8*
Anfangstitrationswerte ccm n/10 NaOH . . .	16,7	16,5	14,5	16,2	14,2

Ansätze Nr.	Verschwundene ccm n/10 NaOH	Synthesegrad in %	Gefundenes α des fermentativ gebildeten Esters, „Esterfraktion"	Einwaage für Verseifung g	Für die Verseifung verbrauchten ccm n/10 NaOH	Für die Verseifung berechneten ccm n/10 NaOH	% Gehalt der Esterfraktion an Ester	Berechnetes $[\alpha]_D$
1	1,40	8,38	+ 0,38°	1,2500	9,8	57,08	17,17	+ 2,21°
2	3,8	23,0	+ 0,92°	1,2210	10,9	55,75	19,55	+ 5,92°
3	4,7	30,96	+ 1,43°	0,9516	9,2	43,96	21,17	+ 6,74°
4	8,45	52,18	+ 5,29°	0,9652	16,1	44,07	35,53	+ 14,81°
5	8,8	61,9	+ 22,80°	1,0454	44,1	47,67	92,53	+ 24,62°

* Neuer Fermentzusatz von 1,8 g.

Der Verlauf der optischen Auswahl-Kurven beim Äthyl-Phenyl-Carbinol und beim Propyl-Phenyl-Carbinol ist sehr ähnlich. Aus beiden Tabellen (III und IV) ergibt sich, daß bis etwa 30 % das Ferment den Ester nur unter schwacher Bevorzugung der d-Modifikation bildet. Sehr stark wird die Auswahl bei 50 %; in Tabelle III scheint sie zwischen 55 und 69 % ein Maximum zu durchschreiten, das in Tabelle IV noch nicht zu erkennen ist. Natürlich muß im Verlauf der optischen Auswahlkurve einmal ein Maximum überschritten werden, da ja bei 100 % Synthese, also bei vollständiger Veresterung *beider* optischen Modifikationen bzw. beim Synthesegleichgewicht, die Polarisationswerte der gebildeten Ester gleich Null werden müssen; nur läßt sich leider die Synthese nicht weiter führen, als wir es bei unseren Versuchen erreichten; es stellt sich bei den in den Tabellen angegebenen Endwerten ein Endgleichgewicht ein, daß sich auch bei tagelanger Synthesedauer und unter wiederholter Zugabe von frischem Fermentpulver nicht mehr ändert.

Als wir die hohen Drehwerte des synthetisierten und isolierten Esters fanden, prüften wir für eine eventuelle Grundlage einer möglichen Erklärung dieses eigentümlichen Phänomens, wie diese Drehwerte von der Konzentration der vorhandenen Buttersäure abhängig sind. Wir

setzten also zu einem Versuch mit Äthyl-Phenyl-Carbinol die Hälfte der sonst angewandten Buttersäuremenge hinzu, so daß wir bereits zu Beginn der Synthese diejenige Säurekonzentration haben, die sonst bei 50%iger Synthese, wo die hohen Polarisationswerte beginnen, vorliegt; dann arbeiteten wir den Ansatz bei 30% Synthesegrad auf und hätten nun schon bei diesem Synthesegrad hohe Drehwerte finden müssen, wenn eine Abhängigkeit des optischen Verhaltens von der Säurekonzentration vorhanden gewesen wäre; indes fanden wir nur eine Bestätigung unserer früher gefundenen Drehwerte, nämlich ein $[\alpha]_D = + 3{,}69^0$ für den vom Ferment gebildeten und isolierten Ester, „Esterfraktion" (vgl. Tabelle III).

Weiterhin machten wir einen Versuch, um die Beeinflußbarkeit der Kinetik durch Zusatz von synthetisch hergestelltem razemischen Ester festzustellen, ebenfalls mit negativem Resultat.

Die Größen der am Kopf der Tabellen III und IV angegebenen Ansätze geben einen Begriff über die Mengen der zur Verwendung gelangten Carbinole. Die bei der Aufarbeitung der Syntheseansätze wiedergewonnenen Carbinole können für neue Syntheseansätze nicht gut verwendet werden, weil eine Beeinflussung der optischen Auswahl durch die in diesen Carbinolen enthaltene l-Komponente des Carbinols zu befürchten war. An dieser Stelle sei bemerkt, daß eine Linksdrehung der Carbinole nach der enzymatischen Veresterung und Aufarbeitung der Syntheseansätze nicht festgestellt werden kann, weil die Verdünnung durch razemisches Carbinol viel zu groß ist; im Gegenteil, bei Aufarbeitung der Syntheseansätze, die die hohen Esterdrehungen zeigen, findet man bei der Polarisation der Carbinolfraktion eine ganz schwache Drehung nach rechts, die darauf zurückzuführen ist, daß mit dem Carbinol bei der Destillation eine gewisse Menge der Esterfraktion im eutektischen Gemisch mit übergeht, die durch ihre hohe Drehung die schwache Rechtsdrehung der Carbinolfraktion hervorruft.

Die von uns gewählte Buttersäurekonzentration ist für unsere Zwecke recht günstig; größere Buttersäurekonzentrationen haben wegen der stärkeren Fermentschädigung einen geringeren Synthesegrad, kleinere eine nicht genügend große Esterausbeute (ohne Verwendung allzu großer Mengen Carbinol) zur Folge.

Der eigentümliche Gang der optischen Auswahlkurve bei der fermentativen Estersynthese widerspricht den Erwartungen; wir sind bis jetzt nicht imstande, eine Erklärung des Phänomens zu geben. Diese Frage wird noch im theoretischen Teil behandelt.

Es folgt die Darstellung der Versuchsergebnisse bei der fermentativen Hydrolyse, die durchweg mit Schweineleberesterase (neutral.,

zentrifugierter Ammoniakauszug) angestellt wurden. Alle Versuche wurden mit demselben Fermentpräparat ausgeführt. Pankreasesterase wurde vorläufig nicht benutzt, weil ihre wässerigen Lösungen wenig beständig sind.

Tabelle V.

Spaltung von Methyl-Phenyl-Carbinyl-Buttersäureester und Äthyl-Phenyl-Carbinyl-Buttersäureester.

Ansätze Nr.:	1	2	1	2
Zeit Minuten	Verbrauchte ccm n/10 NaOH		Prozentuelle Spaltung	
15	6,32	4,44	12,4	9,54
30	12,2	8,49	24,1	18,3
45	17,3	11,3	37,3	24,4
60	21,3	13,7	42,0	29,6

Ansätze: Je 20 ccm Leberextrakt, 80 ccm Wasser, 1 ccm Substrat.

Ansatz 1: Methyl-Phenyl-Carbinyl-Buttersäureester,
„ 2: Äthyl-Phenyl-Carbinyl-Buttersäureester.

Aus Tabelle V ist die Spaltung der Buttersäureester des Methyl-Phenyl-Carbinols und des Äthyl-Phenyl-Carbinols ersichtlich. Der Buttersäureester des Methyl-Phenyl-Carbinols wird schneller gespalten als der des Äthyl-Phenyl-Carbinols. Wir haben nur den einstündigen Verlauf der Spaltung in die Tabelle eingetragen, die in dieser Zeit bis zu dem angegebenen Spaltungsgrad geht. Man kann indessen, wie auch aus der später angeführten optischen Auswahl-Kurve ersichtlich ist, die Hydrolyse glatt bis 85 bis 90% Spaltung durchführen; sie dauert dann ungefähr 5 Stunden. Bis 50% Spaltung ist der Kurvenverlauf ziemlich linear, dann flacht er erheblich ab.

Unsere Ester werden also sehr gut gespalten. Wir machten jedoch die Beobachtung, daß nach einigen Tagen die Spaltbarkeit abnimmt, um schließlich ganz aufzuhören. Bei der Untersuchung dieser Erscheinung stellten wir fest, wie bereits im präparativen Teil erwähnt wurde, daß die Buttersäureester unserer Carbinole sich spontan unter Bildung von Buttersäure und dem entsprechenden ungesättigten Kohlenwasserstoff zersetzen. Dieser Befund erklärt das Abnehmen der Spaltbarkeit unserer Ester nach mehrtägigem Stehen, da die entstehenden ungesättigten Kohlenwasserstoffe die Spaltung dieser Substrate hemmen. Die Ester der höheren homologen Carbinole sind nie völlig frei von ungesättigtem Kohlenwasserstoff zu erhalten; sie zersetzen sich teilweise bereits während der Vakuumdestillation nach der Darstellung. Deswegen haben wir keine Hydrolysenkurven für die Buttersäureester des Propyl-Phenyl-Carbinols und des Butyl-Phenyl-

Carbinols aufgenommen; die erhaltenen Werte sind nicht völlig reproduzierbar.

Sehr gut reproduzierbar sind indessen die in Tabelle V angegebenen Hydrolysenwerte für die Buttersäureester des Methyl-Phenyl-Carbinols und des Äthyl-Phenyl-Carbinols. Voraussetzung für die Reproduzierbarkeit ist jedoch, daß die fermentative Spaltung sofort nach der Destillation des Substrats, die stets zweimal ausgeführt werden muß, vorgenommen wird. Unsere Hydrolysenkurven für den Äthyl-Phenyl-Carbinyl-Buttersäureester, an dem wir die Mehrzahl unserer Versuche ausführten, sind bei Präparaten aus den verschiedenen Darstellungsansätzen immer vollständig übereinstimmend.

Notiert zu werden verdient auch die Beobachtung, daß nach kürzerem Stehenlassen der Ester (mehrere Stunden bis 2 Tage) eine bedeutend schnellere fermentative Spaltung eintritt; es scheint, als ob der entstehende ungesättigte Kohlenwasserstoff in sehr geringen Konzentrationen bei unserem Substrat und unserer Versuchsanordnung die Spaltung aktiviert.

Unsere Ester sind im Wasser praktisch unlöslich; es tritt also Sättigung der wässerigen Lösung mit dem Substrat bei allen Substratkonzentrationen ein. Trotzdem ergibt sich aus den in der folgenden Tabelle VI eingetragenen Daten eine deutliche Abhängigkeit der Hydrolysengeschwindigkeit von der Substratkonzentration.

Tabelle VI.

Abhängigkeit der Hydrolysengeschwindigkeit von der Substratkonzentration (Die Zahlen bedeuten die bei der Spaltung verbrauchten Kubikzentimeter n/10 NaOH.)

Zeit	Substratkonzentrationen in Vol.-%			
Minuten	0,5	1	2	3
15	2,97	3,06	4,35	4,7
30	4,35	7,15	9,58	8,3
45	6,22	11,05	13,7	12,8
60	7,01	12,9	16,1	14,0
75	8,40	15,95	19,8	16,2
90	10,8	17,6	21,7	18,2
105	11,3	19,8	25,6	20,8
120	11,3	21,9	27,2	21,6

Wir ersehen, daß in der dritten Spalte ein deutliches Maximum der in gleichen Zeiten frei werdenden Buttersäuremengen vorliegt. Wir haben hier vier Punkte einer Aktivitäts-P_s-Kurve vor uns. Daß eine solche überhaupt möglich ist, ist schon ein Beweis dafür, daß nicht

nur die gelösten Anteile des Substrats für die Reaktionskinetik maßgeblich sind, denn ihre Konzentrationen sind ja in allen Fällen gleich. Es kann also in solchen Fällen das Massenwirkungsgesetz zur Erklärung der Aktivitäts-P_s-Kurven kaum herangezogen werden.

Es wurde nun untersucht, ob die Körper, die bei verschiedener Darstellung der Carbinole entstehen und einen so bedeutenden Einfluß auf die Kinetik der fermentativen *Synthese* haben, sich als Zusatzkörper auch bei der *Hydrolyse* der Ester in analoger Weise bemerkbar machen. Zunächst wurde der Buttersäureester eines Methyl-Phenyl-Carbinols, der durch Reduktion von Acetophenon gewonnen war, dargestellt und fermentativ gespalten. Wir finden bei Anwendung von Schweineleberesterase unter denselben Versuchsbedingungen, wie sich aus Tabelle VII ergibt, im Gegensatz zu der Spaltung des nach *Grignard* dargestellten Carbinols, eine etwas aktivierte Spaltung (vgl. Tabelle V), keine Hemmung.

Tabelle VII.

Spaltung von Methyl-Phenyl-Carbinyl-Buttersäureester; Methyl-Phenyl-Carbinol dargestellt aus Acetophenon.

Zeit in Minuten	Verbrauchte ccm n/10 NaOH	Prozentuelle Spaltung
15	11,0	21,6
30	19,5	38,3
45	24,8	47,7
60	27,3	53,7

Ansätze: 1 ccm Ester, 20 ccm Leberextrakt, 80 ccm Wasser.

Tabelle VIII gibt Versuche, in denen wir die verschiedenen Carbinole unverändert zu dem Äthyl-Phenyl-Carbinyl-Buttersäureester hinzusetzten und den Einfluß dieser Zusätze auf die fermentative Hydrolyse beobachteten.

Tabelle VIII.

Spaltung von Äthyl-Phenyl-Carbinyl-Buttersäureester unter Zusatz verschiedener Carbinole. (Die Zahlen in der linken Tabellenhälfte bedeuten verbrauchte Kubikzentimeter n/10 NaOH, in der rechten den Spaltungsgrad in Prozenten.)

Zeit Min.	Ohne Zusatz	a	b	c	d	Ohne Zusatz	a	b	c	d
15	4,0	1,6	2,0	1,6	2,5	8,52	3,40	4,27	3,40	5,23
30	8,0	3,3	4,0	3,3	4,7	17,4	7,04	8,54	7,40	10,0
45	10,6	6,1	7,7	6,4	6,8	22,6	13,0	16,42	13,6	14,6
60	13,0	7,0	9,0	8,0	8,4	27,7	14,95	19,10	17,10	17,8

Ansätze: 1 ccm Ester auf 100 ccm Fermentlösung (20 ccm Leberextrakt, 80 ccm Wasser), dazu zu

a) 1 ccm Äthyl-Phenyl-Carbinol nach *Grignard*
b) 1 „ Äthyl-Phenyl-Carbinol aus dem Keton
c) 1 „ Propyl-Phenyl-Carbinol nach *Grignard*
d) 1 „ Propyl-Phenyl-Carbinol aus dem Keton

Wir sehen, daß die Zusätze die Hydrolyse unseres Esters hemmen, aber alle in gleichem Maße. Unterschiede, verursacht durch den verschiedenen Reinheitsgrad der Carbinole können bei der Hydrolyse nicht beobachtet werden.

In der Literatur[1] wird Methyl-Phenyl-Carbinol als Zusatzkörper zur Hydrolyse von Methyl-Butyrat als stark hemmend gegen dieses Substrat angegeben. Wir konnten diesen Befund bestätigen und auch beim Äthyl-Phenyl-Carbinol den gleichen Effekt beobachten. Eine der Ursachen für die hemmende Wirkung eines Zusatzkörpers bei der Hydrolyse eines bestimmten Substrats ist die, daß der Zusatzkörper eine größere Affinität zum Ferment hat als das Substrat. Das Äthyl-Phenyl-Carbinol müßte also, da es die Spaltung von Methyl-Butyrat hemmt, eine recht bedeutende Affinität zum Ferment haben. Die von uns untersuchten Ester werden jedoch sehr glatt gespalten, obgleich sie Äthyl-Phenyl-Carbinol als Alkoholkomponente haben. Hieraus könnte geschlossen werden, daß unser Ester eine noch größere Affinität zum Ferment besitzt als das Äthyl-Phenyl-Carbinol.

Es ist bekannt[1], daß Aceton als Zusatzkörper zu den verschiedensten Substraten deren Spaltung ebenfalls stark hemmt. Unter Berücksichtigung der großen Affinität unseres Esters nahmen wir an, daß der Zusatz von Aceton zu unserem Ester dessen Hydrolyse wenig oder gar nicht beeinflussen würde. Das Experiment bestätigt unsere Überlegung. Tatsächlich hemmt das Aceton in unserem Falle so gut wie gar nicht, wenigstens nicht in den von uns untersuchten Konzentrationen. Genaueres läßt sich hier, wie in allen ähnlichen Fällen, nur durch Aufstellung einer Aktivitäts-P_s-Kurve aussagen.

Tabelle IX enthält die Versuchsergebnisse; in Spalte c ist noch die Hydrolysengeschwindigkeit unseres Esters in Gegenwart von Acetophenon wiedergegeben, der in der Literatur ebenfalls als Hemmungskörper genannt ist[1]; seine hemmende Wirkung führen wir aber neben einer besonderen Affinität zum Ferment noch auf die Löslichkeit des Substrats in dem wasserunlöslichen Keton zurück (s. theoretischer Teil).

[1] *Murray*, Biochem. J. **23**, 292, 1929; *Murray* u. *King*, ebendaselbst **24**, 190, 1930 und *Glick* u. *King*, J. of biol. Chem. **14**, 497, 1931; vgl. auch *E.* u. *E. Stedman*, Biochem. J. **25**, 1147, 1931 (stark hemmende Wirkung von Urethanen auf die fermentative Tributyrin und Methylbutyrat-Hydrolyse.

Tabelle IX.

Hydrolyse von Äthyl-Phenyl-Carbinyl-Buttersäureester in Gegenwart von Aceton und Acetophenon. (Die Zahlen bedeuten in der linken Tabellenhälfte die verbrauchten Kubikzentimeter n/10 NaOH, in der rechten den prozentualen Spaltungsgrad.)

Zeit Min.	Ohne Zusatz	a	b	c	Ohne Zusatz	a	b	c
15	4,4	3,8	3,7	1,5	9,35	8,1	7,9	3,2
30	8,0	8,8	7,3	3,8	17,0	18,7	15,5	8,1
45	11,8	19,9	10,0	4,5	25,2	25,6	21,4	9,6

Ansätze: 1 ccm Ester auf 100 ccm Fermentlösung (20 ccm Leberextrakt, 80 ccm Wasser). Dazu zu

a) 2 ccm Aceton
b) 3 „ „
c) 1 „ Acetophenon

Es lag in unserer Absicht, auch Mandelsäuresester mit optisch aktiven Alkoholen zu spalten, um die optischen Verhältnisse bei der Spaltung eines Esters mit zwei Asymmetriezentren zu studieren. Als einfachstes Beispiel wählten wir den Mandelsäure-sekundären Butylester. Dieser Ester erwies sich jedoch als nicht spaltbar. Dies beruht wahrscheinlich auf der hohen Affinität des Esters zum Ferment und auf der geringen Zerfallsgeschwindigkeit der Ferment-Esterverbindungen, außerdem aber noch auf dem hemmenden Einfluß des entstehenden sekundären Butylalkohols. Wir setzten ferner zu Mandelsäuremethylester sekundären Butylalkohol (Methyl-Äthyl-Carbinol) hinzu und erhielten eine deutliche Hemmung, die aus der folgenden Tabelle X ersichtlich ist.

Tabelle X.

Spaltung von d, l-Mandelsäuremethylester in Gegenwart von d, l-sekundärem Butylalkohol. (Die Zahlen in der linken Tabellenhälfte bedeuten die verbrauchten Kubikzentimeter n/10 NaOH, in der rechten den prozentualen Spaltungsgrad.)

Zeit Min.	Ohne Zusatz	Mit Zusatz	Ohne Zusatz	Mit Zusatz
15	7,5	5,5	24,9	15,9
30	13,1	7,9	43,5	26,2
45	18,1	10,6	60,0	35,1
60	23,4	12,5	76,5	41,5

Ansätze: 0,5 g Ester auf 100 ccm Fermentlösung (20 ccm Leberextrakt, 80 ccm Wasser), dazu 2 ccm d, l-sekundären Butylalkohol.

Es folgen unsere Ergebnisse über die stereo-spezifischen Verhältnisse bei der Hydrolyse unserer Ester.

Tabelle XI.

Abhängigkeit der optischen Auswahl vom Spaltungsgrad (optische Auswahl-Kurve). Substrat: dl-Äthyl-Phenyl-Carbinyl-Buttersäureester.

Spaltungsgrad %	Gefundene α der Esterfr.	Einwaage für Verseifung	Berechnete ccm NaOH für Verseifung	Gefundene ccm NaOH für Verseifung	Gehalt der Esterfr. an Ester	Berechnete $[\alpha]_D$ der Esterfr.
0,95	— 0,11°	0,6736	32,7	15,35	46,9	— 0,23°
19,65	— 0,37	0,7582	36,8	20,45	54,3	— 0,67
29,7	— 0,94	0,8346	40,51	10,05	24,8	— 3,78
30,0	— 1,50	0,8344	40,51	16,85	41,6	— 3,63
50,0	— 4,00	0,6437	31,25	21,95	70,2	— 5,80
56,0	— 1,95	0,7820	37,99	12,80	36,5	— 5,3
80,4	— 5,34	0,8574	41,62	35,05	84,2	— 6,3

Ansätze: 5 ccm Ester, 100 ccm Leberextrakt, 400 ccm Wasser.

Diese Tabelle stellt Versuchsansätze zusammen, in denen der unverseift zurückgebliebene Ester polarisiert wurde. Es ist ersichtlich, daß er linksdrehend ist und daß also das Ferment bei der Hydrolyse des racemischen Esters den d-Ester schneller spaltet.

In zwei Versuchen (Spaltungsgrad von ungefähr 30 und 50%) wurde der aus dem Ester vom Ferment in Freiheit gesetzte *Alkohol* wiedergewonnen und polarisiert. Im 1-dm-Rohr wurden folgende α-Werte erhalten: + 0,41 und — 0,02°. Die geringe Linksdrehung des zweiten wiedergewonnenen Carbinols beruht auf der stärkeren Linksdrehung des bei der Destillation mit übergegangenen Esters, die die Rechtsdrehung des Alkohols überdeckt. Zur Aufarbeitung dieser Versuche wurden je vier gleiche Ansätze (6 ccm Ester, 100 ccm Leberextrakt, 300 ccm Wasser) bis zu dem gleichen Spaltungsgrad gebracht (30 und 50%) und deren Ätherauszüge vereinigt, um die für die Polarisation nötige Carbinolmenge zu gewinnen.

Da *Bamann*[1] durch Änderung der Substratkonzentration bei der Spaltung des d, l-Äthylmandelats durch einige Esterasen eine Änderung der Konfigurationsspezifität der Enzyme fand, so prüften wir, ob wir auch diese Erscheinung bei der fermentativen Hydrolyse unseres Esters beobachten konnten. Wir ergänzten daher die in der Tabelle XI angegebenen Versuche mit chemischer Aufarbeitung des unverseift zurückgebliebenen Esters durch neue Ansätze, in denen wir einmal statt 5 ccm bei sonst gleichen Bedingungen 2,5 ccm des racemischen Esters, und das andere Mal 10 ccm desselben Esters benutzten und bei 30 und 50%

[1] Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **62**, 1538, 1929; siehe auch *Rona, Fischgold* u. *Ammon*, diese Zeitschr. **228**, 77, 1930. Ob eventuell beigemengte ungesättigte Kohlenwasserstoffe, die durch Destillation nicht zu entfernen sind, die Konfigurationsspezifität der Esterhydrolyse beeinflussen, sei dahingestellt.

Spaltung die fermentative Hydrolyse unterbrachen. Es scheint in dem von uns gewählten Konzentrationsbereich keine Abhängigkeit der Konfigurationsspezifität der Schweineleberesterase von der Konzentration des d, l-Äthyl-phenyl-carbinyl-butyrats zu herrschen. Wir finden bei je 30% Spaltungsgrad für die beiden Konzentrationen die $[\alpha]_D$-Werte von: $-4{,}5$ und $-3{,}8^0$, bei 50% Spaltungsgrad die $[\alpha]_D$-Werte von: $-5{,}26$ und $-5{,}86^0$.

Theoretischer Teil.

Die fermentative Synthese geht in einem Milieu vor sich, das unphysiologisch ist. Man arbeitet in alkoholischer Lösung der zu veresternden Säure bei großem Alkoholüberschuß; zu dieser Lösung setzt man das Organtrockenpulver hinzu, das das Ferment enthält. Ist der Alkohol oder die Säure fest oder sind die beiden Komponenten in einander nicht löslich, so kann man sogar in acetonischem Milieu gute Synthese erreichen. Das sind Bedingungen, unter denen die für die Hydrolyse verwendeten Fermentextrakte sofort vollkommen zerstört und absolut unwirksam gemacht werden. Auch von einer $[H^{\cdot}]$ kann man bei der alkoholischen oder acetonischen Lösung, bei der die fermentative Synthese vonstatten geht, nicht gut sprechen.

Trotz dieser eigentümlichen Bedingungen ist es gelungen, eine ganze Reihe von verschiedenartigsten Estern zu synthetisieren, es ist sogar die Synthese eines natürlichen Wachses, des Cetylpalmitats[1], gelungen, das bisher fermentativ noch nicht gespalten werden konnte. Unsere untersuchten Carbinole vom Typ $C_6H_5 . CHOH . R$ vervollständigen das bis jetzt vorliegende Material.

Man ist gezwungen, bei der fermentativen Synthese stets mit dem Organtrockenpulver zu arbeiten[1]. Daß überhaupt eine Synthese unter den erwähnten Bedingungen zustande kommt, kann darauf zurückgeführt werden, daß das Ferment im Pulverzustand in einer besonders geschützten Form sich befinden muß.

Im allgemeinen muß man bei der Synthese bedeutend mehr Fermentpulver verwenden als bei der Hydrolyse. Die Esterhydrolyse geht bei Verwendung von Leber- und Pankreas-Auszügen glatt vor sich; die Synthese geht mit Pankreaspulver in den meisten Fällen sehr gut; Leberpulver hingegen verestert unsere Substrate überhaupt nicht, wenn die gleiche Menge Leberpulver wie Pankreaspulver hinzugegeben wird; schwache Synthese erhält man, wenn man dreimal soviel Leber- wie Pankreaspulver verwendet. Auch bei den meisten anderen untersuchten Substraten kann man die allgemeine Erfahrung machen, daß Leber-

[1] *Rona, Ammon* u. *Fischgold*, diese Zeitschr. **241**, 460, 1931.

pulver fast immer schlecht esterifiziert[1]. Dies kann zwei Ursachen haben: Entweder enthält die Leber wenig (synthetisierendes) Ferment oder die zu veresternden Substrate (bzw. die in geringen Mengen entstandenen Ester) haben eine so große Affinität zum Ferment und die entstandenen Ferment-Substratverbindungen eine so geringe Zerfallsgeschwindigkeit — falls wir die von der fermentativen Hydrolyse gewonnenen Vorstellungen auf die fermentative Synthese übertragen —, daß durch Beschlaglegung des Ferments eine Synthese nicht möglich wird. Beispiele hierfür gibt es bei der fermentativen Hydrolyse eine ganze Anzahl. Denken wir an die Versuche von *Bamann* und *Schmeller*[2], Laktone fermentativ zu hydrolysieren; hierbei zeigte es sich, daß die bei diesen Körpern vorhandenen inneren Anhydridbindungen durch die Esterasen nicht angegriffen wurden; setzte man jedoch die Laktone als Zusatzkörper zur Methylbutyrat-Hydrolyse hinzu, so wurde diese stark gehemmt, eben wegen der besonders großen Affinität der Laktone zu den Esterasen. Weiter sei als Beispiel die von *Willstätter, Kuhn, Lind* und *Memmen*[3] aufgeworfene Frage der „Induktion" bei der Hydrolyse von Mandelsäure-Äthylester erwähnt; hierbei stellte es sich heraus, daß das hydrolysierende Ferment durch geringe Beimengungen von Benzoyl-Ameisensäureester, der eine etwa 5000mal so große Affinität (bei sehr geringer Zerfallsgeschwindigkeit) zum Ferment hat wie der Mandelsäure-Äthylester, völlig mit Beschlag belegt wurde, so daß die Hydrolyse des Mandelsäureesters erst dann vor sich gehen konnte, wenn die sehr langsam verlaufende Spaltung des Benzoyl-Ameisensäureesters beendet war[4].

Die Nichtangreifbarkeit eines Substrats durch ein Ferment (bei der Hydrolyse wie bei der Synthese) kann also gerade durch besonders hohe Affinität des Substrats zum Ferment hervorgerufen werden, während umgekehrt ein Substrat mit geringer Affinität, aber großer Zerfallsgeschwindigkeit der entstehenden Ferment-Substratverbindungen ausgezeichnet angegriffen wird.

Die allgemeine Spezifität der synthetisierenden Fermente ist sehr wenig ausgeprägt. Es werden mit ungefähr der gleichen Leichtigkeit die verschiedenartigsten Typen von Alkoholen und Säuren verestert[5]. Wohl aber zeigt sich bei der Synthese, wie bei der Hydrolyse, eine ausgesprochene Stereo-Spezifität. Bei allen unseren Carbinolen wird die d-Form bei der Veresterung bevorzugt; unsere „Esterfraktionen"

[1] Siehe auch *Rona* u. *Mühlbock*, diese Zeitschr. **223**, 130, 1930.
[2] Zeitschr. f. physiol. Chem. **194**, 141, 1931.
[3] Ebendaselbst **167**, 303, 1927.
[4] *Bamann* u. *Schmeller*, ebendaselbst **188**, 251, 1930.
[5] Siehe auch *Rona* u. *Mühlbock*, l. c. und *Fabisch*, diese Zeitschr. **234**, 84, 1931.

nach der chemischen Aufarbeitung der Syntheseansätze sind rechtsdrehend.

Bei der Hydrolyse ist der Gang der optischen Auswahl in Abhängigkeit vom Spaltungsgrad am Beispiel der Mandelsäureester eingehend studiert worden[1]. Die erhaltenen „optischen Auswahlkurven" entsprechen den theoretischen Vorstellungen, die man sich bei Heranziehung des Massenwirkungsgesetzes für diese Vorgänge machen kann. Da nach dem Massenwirkungsgesetz die Reaktionsgeschwindigkeiten sich proportional den vorhandenen Konzentrationen verhalten, so muß bei der Hydrolyse racemischer Ester bei Bevorzugung einer optischen Modifikation durch das Ferment diese um so besser gespalten werden, in je größeren Konzentrationen sie vorliegt, d. h. zu Beginn der Hydrolyse. An diesem Punkt muß die optische Auswahl ihr Maximum haben und dann immer mehr abnehmen, bis bei 100%iger Hydrolyse die Auswahl wieder gleich Null wird, da dann beide Komponenten vollständig gespalten worden sind und wieder ein racemisches Gemisch vorliegt. Tatsächlich liegt bei der optischen Auswahlkurve des Mandelsäuremethylesters das Maximum der Auswahl bei etwa 30% Spaltungsgrad. Auch bei der optischen Auswahlkurve unseres Esters (Tabelle XI), dessen Asymmetriezentrum in der Alkoholkomponente liegt, können wir qualitativ eine Abnahme der optischen Auswahl vor 50% Spaltungsgrad feststellen. Denn mit fortschreitender Hydrolyse nimmt die zurückbleibende Estermenge immer mehr ab; ein nur leichtes Ansteigen der Drehwerte muß also schon allein durch die Anreicherung des optischen Antipoden im Racemat erfolgen. Dieser Anstieg müßte aber, wenn die Auswahl wie bei der fermentativen Estersynthese kein Maximum durchschreiten, sondern ständig anwachsen würde, bedeutend größer sein als die im Experiment gefundene Zunahme (vgl. die hohe Zunahme der Drehwerte bei den analogen Versuchen in der Synthese-Auswahlkurve).

Unsere bei der Synthese erhaltenen Auswahlkurven für Äthyl-Phenyl-Carbinol und Propyl-Phenyl-Carbinol lassen sich durch auf dem Massenwirkungsgesetz aufgebaute Annahmen in keiner Weise erklären. Ihr Gang ist außerordentlich merkwürdig: Bis ungefähr 30% Synthesegrad ist die optische Auswahl nur schwach, dann steigen aber bei 50% Synthesegrad die Drehwerte sehr stark an, beim Äthyl-Phenyl-Carbinol scheint ein Maximum durchschritten zu werden, beim Propyl-Phenyl-Carbinol ist ein solches auch bei 70% Synthesegrad nicht festzustellen.

Ein Maximum der optischen Auswahl muß natürlich auch bei der Synthese irgendwann einmal durchlaufen werden, weil bei 100%iger Synthese wieder ein Racematgemisch vorliegen muß. Wir können aber

[1] *Rona, Fischgold* u. *Ammon*, diese Zeitschr. 228, 77, 1930.

die Synthese nicht weiter fortführen, als wie wir es getan haben; wie bereits erwähnt, stellt sich ein Synthese-Stillstand ein, der sich nicht mehr ändert. Wir müßten aber, wenn die Synthese sich weiterführen ließe, einen ganz rapiden Abfall der Drehwerte von 70% Synthesegrad bis zum Schluß finden.

Wir sind noch nicht in der Lage, den Verlauf der optischen Auswahlkurve nach irgendeiner Richtung hin zu deuten. Die Vorgänge bei der Synthese, bei der man in makroheterogenen Systemen arbeitet, sind noch recht undurchsichtig; es liegt auch bis jetzt ein viel zu geringes experimentelles Material vor.

Wir haben den gleichen Verlauf der optischen Auswahlkurve an zwei homologen Substraten feststellen können; Doppelversuche bestätigen immer die gefundenen Werte; aber trotz dieser Übereinstimmungen werden wir gerade bei der Synthese Verallgemeinerungen gegenüber zu einer gewissen Vorsicht gezwungen, vor allem durch Erscheinungen, die wir bei der fermentativen Estersynthese beobachten konnten und jetzt näher beschreiben wollen.

Es wurde bereits erwähnt, daß anscheinend identische Substrate, die nach verschiedenen Darstellungsmethoden gewonnen wurden, eine grundverschiedene Synthese-Kinetik aufweisen. In unserem Falle werden die nach der Methode von *Grignard* dargestellten Carbinole sehr gut, die durch Reduktion der entsprechenden Ketone dargestellten Carbinole überhaupt nicht oder doch nur zu einem verschwindend geringen Grade mit Buttersäure fermentativ verestert.

Für diese eigentümliche Erscheinung wären folgende Erklärungsmöglichkeiten zu erwägen: Entweder sind die nach *Grignard* dargestellten Carbinole besonders rein und werden daher gut verestert; die aus den Ketonen dargestellten Carbinole enthalten alle einen während der Darstellung entstandenen Zusatzkörper, der hemmend auf die Synthese wirkt. Oder die aus den Ketonen dargestellten Carbinole sind besonders rein und werden gerade deswegen nicht verestert, weil ihnen zur Synthese ein Aktivator fehlt, der in den nach *Grignard* dargestellten Carbinolen vorhanden ist.

Uns scheint die zweite Erklärungsmöglichkeit näher zu liegen. Denn ohne Zweifel kann man vom chemischen Standpunkt aus die aus den Ketonen dargestellten Carbinole als reiner ansehen. Sie gehen absolut konstant bei der Destillation über und färben sich auch nach monatelangem Stehen nicht gelblich, im Gegensatz zu den *Grignard*-Carbinolen, die diese Gelbfärbung stets ziemlich bald aufweisen und niemals so konstant destillieren. Dann ist der chemische Vorgang bei der Reduktion der Ketone durch Natrium und Alkohol vollkommen durchsichtig; es kann bei einer so milden Reduktion keine Nebenreaktion, die zu unbekannten Produkten führt, eintreten. Bei der *Grignard*-Reaktion dagegen können noch eine ganze Reihe von nicht erwünschten Nebenreaktionen vorkommen; man denke nur daran, daß das Magnesium unter bestimmten Bedingungen reduzierend wirkt, so daß man Benzylalkohol als Verunreinigung erhalten kann, ferner an den Benzaldehyd, von dessen Beschaffenheit die Reaktion ebenfalls

abhängig ist usf. Auch in der Literatur werden die aus den Ketonen hergestellten Carbinole als reiner als die nach *Grignard* dargestellten bezeichnet.

Wir entschließen uns also zu der Annahme, daß für die Synthese unserer Carbinole ein bisher unbekannter Aktivator nötig ist und behalten die weitere Verfolgung dieses Problems einer späteren Arbeit vor; hier kam es uns nur darauf an, das Phänomen als solches darzulegen.

Ein Substrat kann durch geringe Beimengungen eines Zusatzkörpers, die sich chemisch ohne weiteres nicht nachweisen lassen, weil es nur Spuren sind, in seinem Verhalten dem Ferment gegenüber grundlegend verändert werden. Hieraus würde folgen, daß, wenn ein Substrat vom Ferment nicht verestert wird, dies nicht nur auf den früher erwähnten Ursachen (Affinitäts- und Zerfallsgeschwindigkeit, Säurekonzentration) beruht, sondern daß das Fehlen eines geeigneten Aktivators ebenfalls ausschlaggebend für das Nichtzustandekommen der Veresterung sein kann.

Hätten wir z. B. das Äthyl-Phenyl-Carbinol nur durch Reduktion aus dem Keton dargestellt, ohne unseren Befund zu kennen, so hätten wir nach Variation der Buttersäurekonzentration usw. mit vollem Recht aussagen dürfen, daß der Alkohol nicht verestert wird, wobei es für diese Betrachtung ganz gleich bleibt, ob die Nichtveresterbarkeit auf besonderen Affinitätsverhältnissen oder darauf beruht, daß überhaupt kein Verhältnis zum Ferment vorliegt.

Am größten ist die Gefahr, unkontrollierbare Beimengungen zu erhalten, bei Flüssigkeiten, deren einzige Reinigungsmöglichkeit die Destillation ist und von denen keine kristallisierten Derivate zu erhalten sind. Nicht kristallisierte Substrate sind daher zum Studium der Fermentwirkungen wenig geeignet.

Wir verweisen an dieser Stelle nochmals auf die von *Willstätter, Kuhn, Memmen* und *Lind* aufgefundene Induktion, deren Kinetik später von *Bamann* und *Schmeller* aufgeklärt wurde. Der Mandelsäure-Äthylester enthält Benzoyl-Ameisensäureester in außerordentlich geringen Mengen, die jedoch wegen der großen Affinität dieses Stoffes zu den Esterasen vollständig genügen, um den Effekt der Induktion hervorzurufen. Die Induktion wurde am Mandelsäure-Äthylester gefunden, der mit einem Schmelzpunkt von 31° bei Zimmertemperatur eine halbkristalline Masse bildet. Der Ester kann jedoch bei tiefen Temperaturen umkristallisiert werden, und auf diese Weise gelingt seine Reinigung vom Benzoyl-Ameisensäureester, nicht aber durch noch so oft wiederholte Destillation. Der Benzoyl-Ameisensäureester wurde nicht direkt in dem Mandelsäure-Äthylester nachgewiesen, sondern durch Hinzufügung von synthetisch dargestelltem Benzoyl-Ameisensäureester zu durch oftmaliges Umkristallisieren hochgereinig-

tem, „induktionsfreiem" Mandelsäure-Äthylester wurde bei der fermentativen Hydrolyse dieses Produktes dieselbe Erscheinung der Induktion beobachtet wie bei dem ungereinigten, und so auf die Anwesenheit von Benzoyl-Ameisensäureester geschlossen. Die Induktion ist eine unseren Beobachtungen ganz analoge Erscheinung. Leider haben wir bei unseren Carbinolen nicht die Möglichkeit der Reinigung durch Umkristallisation, so daß wir auf so einfache Weise den in den *Grignard*-Alkoholen enthaltenen Aktivator nicht abtrennen können. Es ist charakteristisch, daß die Induktion gerade bei dem halbfesten Mandelsäure-Äthylester, nicht aber bei dem gut kristallisierenden und leicht zu reinigenden Mandelsäure-Methylester gefunden wurde.

Wegen der großen Beeinflußbarkeit der optischen Spezifität bei der fermentativen Hydrolyse durch geringe Mengen verschiedenster Zusatzkörper müssen wir eine solche Beeinflußbarkeit auch bei der Synthese zum mindesten in Rechnung ziehen. Wir wissen nicht, ob und inwiefern Zusatzstoffe bei der Synthese die optische Auswahl beeinflussen; unsere Versuche waren bis jetzt gut reproduzierbar; trotzdem müssen wir an die Möglichkeit denken, daß z. B. unsere Aktivatoren in den *Grignard*-Carbinolen auf das optische Auswahlvermögen der Esterase wirken. Ehe diese Fragen nicht geklärt sind, wozu es noch eines großen experimentellen Materials bedarf, können wir unseren optischen Auswahlkurven nur einen relativen Wert zuerkennen.

Obwohl der Reaktionsmechanismus bei der Synthese im Prinzip der gleiche zu sein scheint wie bei der Hydrolyse (Aufstellungsmöglichkeiten von Aktivitäts-P_s-Kurven auch bei der Synthese), so liegen doch bei der Synthese andere Affinitätsverhältnisse als bei der Hydrolyse vor.

Schon die Tatsache, daß unsere Carbinole überhaupt verestert werden, ist ein Beweis für das Vorhandensein von der Hydrolyse verschiedener Affinitäten, denn die Carbinole sind bei der Hydrolyse vieler Substrate stark hemmende Zusätze. Auch der sekundäre Butylalkohol, der ebenfalls in den meisten Fällen als Zusatz zur Hydrolyse hemmt, wird fermentativ verestert.

Die Formen der optischen Auswahlkurven unterscheiden sich zuweilen bei der fermentativen Hydrolyse und Synthese. Mandelsäureester werden stets asymmetrisch gespalten, jedoch symmetrisch aufgebaut.

Aceton hemmt die Hydrolyse bei den meisten Substraten schon in geringen Konzentrationen. Größere Acetonkonzentrationen verursachen schon durch die von ihnen verursachte Eiweißfällung in den Fermentextrakten Hemmung der hydrolytischen Wirkung. Bei der fermentativen Synthese dagegen kann sogar in acetonischem Milieu

Synthese vor sich gehen. Rückschlüsse von Verhältnissen bei der Hydrolyse auf solche bei der Synthese sind daher im allgemeinen keineswegs erlaubt.

Bezüglich der „hemmenden" Wirkung der Zusatzkörper sei auf folgendes hingewiesen. Fügt man Äthyl-Phenyl-Carbinol als Zusatzkörper zur Hydrolyse seines Buttersäureesters hinzu, so tritt deutliche Hemmung ein. Nun ist der Ester, ebenso wie das Äthyl-Phenyl-Carbinol, in Wasser unlöslich, beide Substrate lösen sich jedoch ausgezeichnet in einander. Infolgedessen geht der Ester, wenigstens zum großen Teil, in das hinzugefügte Äthyl-Phenyl-Carbinol, also in die wasserunlösliche Phase, wodurch der Einfluß der fermentativen Wirkung erschwert wird. Da eine Verminderung der Esterkonzentration eine Verminderung der Hydrolysengeschwindigkeit mit sich bringt (vgl. Tabelle VI), so muß schon aus diesem Grunde der Zusatz von Äthyl-Phenyl-Carbinol die Spaltung des Esters beeinflussen[1].

Was die Abhängigkeit der Spaltbarkeit wasserunlöslicher Substrate von ihren Konzentrationen betrifft, so haben wir eine solche Abhängigkeit bei der Spaltung des Äthyl-Phenyl-Carbinyl-Buttersäureesters gefunden. *Bamann* und Mitarbeiter stellten sie für das Methylbutyrat fest, das, wenn es auch nicht unlöslich wie unser Ester, so doch zweifellos schwer löslich in Wasser ist. Die Berechtigung, zur Erklärung der Aktivitäts-P_s-Kurven das Massenwirkungsgesetz heranzuziehen, ist bei solchen Systemen fraglich. Bei Suspensionen von wasserunlöslichen Substraten ist es für die Konzentration der wässerigen Phase gleich, ob man viel oder wenig suspendiert; die wässerige Phase ist mit dem Substrat immer gesättigt. Man wird nicht umhin können, die Adsorptionsgesetze als Grundlage für den Reaktionsmechanismus der Fermente zu berücksichtigen[2].

Zusammenfassung.

1. Die folgenden Carbinole wurden dargestellt: Methyl-Phenyl-Carbinol, Äthyl-Phenyl-Carbinol, Propyl-Phenyl-Carbinol, Butyl-Phenyl-Carbinol. Alle vier Carbinole wurden nach der Reaktion von *Grignard*, die ersten drei Glieder der homologen Reihe außerdem durch Reduktion der entsprechenden Ketone dargestellt.

Die Buttersäureester dieser Carbinole wurden dargestellt und es wurde auf einige chemische Eigentümlichkeiten der dargestellten Substrate hingewiesen.

---

[1] Vgl. in diesem Zusammenhang die Beobachtungen von *Murray* und *King*, Biochem. J. **23**, 292, 1929.

[2] Siehe hierzu die Arbeiten von *Hitchcock*, *Weidenhagen*, wie auch *Fischgold* u. *Ammon* (hier auch Literatur), diese Ztschr. 1932 in Druck, wonach eine Aktivitäts-P_s-Kurve auch durch eine Adsorptionsisotherme gedeutet werden kann.

2. Die Buttersäureester aller genannten Carbinole können fermentativ gebildet und gespalten werden.

3. Bei der fermentativen Bildung und Spaltung dieser Ester zeigen die verwendeten Esterasen eine ausgesprochene Konfigurationsspezifität, und zwar wird bei der Synthese, die mit Schweinepankreas-Ferment ausgeführt wurde, die d-Form schneller verestert und die gleiche Form bei der Hydrolyse der Ester, die aus experimentellen Gründen mit Schweineleberextrakt ausgeführt wurde, schneller gespalten.

4. Bei völliger Abwesenheit von Wasser geht die fermentative Estersynthese langsamer, führt jedoch zu einer weiteren Verschiebung des Gleichgewichts im Sinne der Esterbildung. Die Veresterungsgeschwindigkeit ist von der verwandten Säurekonzentration abhängig.

5. Die Synthese unserer Carbinole ist abhängig von gewissen, noch nicht näher untersuchten Aktivatoren, die in den nach *Grignard* dargestellten Carbinolen enthalten sind, nicht aber in den durch Reduktion der Ketone dargestellten Carbinolen.

6. Der Gang der optischen Auswahl bei der fermentativen Synthese wurde an zwei Beispielen studiert. Die Auswahlkurve zeigt einen eigentümlichen Gang, dessen Deutung noch nicht gegeben werden kann.

Lebenslauf.

Ich, Ernst Chain, bin als Sohn des Chemikers Dr. phil. Michael Chain und seiner Ehefrau Margarethe, geborene Eisner, am 19. Juni 1906 zu Berlin geboren. Ich besuchte das humanistische staatliche Luisen-Gymnasium zu Berlin und bestand dort im Frühjahr 1924 die Reifeprüfung. Im Wintersemester 1924/1925 wurde ich an der Friedrich-Wilhelm-Universität zu Berlin immatrikuliert. Ich studierte Naturwissenschaften, insbesondere Chemie, und hörte Vorlesungen der Professoren:

Schlenk, Nernst, Bodenstein, Erhardt Schmidt, Paneth, Kopsch, Köhler, Wertheimer, Maier, Dessoir.

Meine praktische chemische Ausbildung erhielt ich bei Herrn Geheimrat Prof. Dr. W. Marckwald (anorganisches Praktikum), Prof. Dr. A. Rosenheim (organisches Praktikum), Prof. Dr. M. Bodenstein (physikalisch-chemisches Praktikum), Prof. Dr. Wehnelt (physikalisches Praktikum). Das erste Verbandsexamen legte ich bei Herrn Geheimrat Marckwald ab, das zweite bei den Herrn Professoren Rosenheim und Bodenstein.

Nach einer vierjährigen unfreiwilligen Unterbrechung meines Studiums begann ich im Januar 1931 meine Doktorarbeit bei Herrn Prof. Dr. P. Rona in der Chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Charité und beendigte sie im Februar 1932. Ich verdanke Herrn Prof. Rona die Anregung zu meinem Thema und gestatte mir ihm für die großzügige Unterstützung der Arbeit, sein lebhaftes Interesse an ihrer Ausarbeitung und seine zahlreichen, wertvollen Ratschläge meinen besten Dank auszusprechen. Gleichfalls möchte ich Herrn Dr. phil. R. Ammon für seine kollegiale und freundschaftliche Hilfe herzlich danken.